

# **Verbesserte FIT-Sonden für die selektive und quantitative RNA-Visualisierung in lebenden Zellen**

Hybridisierungssonden für biologische Anwendungen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M. Sc. Jasmine Chamiolo

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät:

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen

1. Prof. Dr. Oliver Seitz

2. Prof. Dr. Andrea Rentmeister

3. Prof. Dr. Hans Börner

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2019



# Kurzzusammenfassung

Die Verwendung von Hybridisierungssonden ermöglicht es in Zelllysaten, fixierten oder auch lebenden Zellen, RNA- und DNA-Zielsequenzen anhand der spezifischen Fluoreszenzemission zu visualisieren. In dieser Arbeit wurden die von Seitz *et al.* entwickelten *forced intercalation* (FIT)-Sonden zur mRNA-Charakterisierung in lebenden Zellen eingesetzt. Die FIT-Sonden enthalten einen Cyaninfarbstoff der Thiazolorange-Familie, welcher die Position einer Nukleobase einnimmt. Nach Bindung der Sonde an die Zielsequenz erfährt der Farbstoff eine deutliche Intensivierung der Fluoreszenzemission.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erfolgte die Synthese verbesserter FIT-Sonden für die systematische Untersuchung der Aufnahme durch lebende *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen. Dafür wurden chemische und physikalische Transfektionsmethoden analysiert. Es wurden sowohl hergestellte FIT-Sonden-Konjugate/Aggregate als auch kommerziell erhältliche Reagenzien, wie die Palmitinsäure sowie das porenbildende Enzym Streptolysin-O auf ihre Effizienz untersucht. Gleichmaßen wurde die Elektroporation der Zellen überprüft. Die optimalen Bedingungen für das Einbringen von DNA- und PNA-FIT-Sonden in *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen lieferte das Enzym Streptolysin-O. Durch den simultanen Einsatz von drei unterschiedlichen Sonden (BO-, TO- und CB-markiert), komplementär zu drei verschiedenen Zielsequenzen, gelang es erstmals eine Dreifarben-Lebendzell-Bildgebung mit FIT-Sonden durchzuführen.

Des Weiteren wurden TO-FIT-Sonden zur Unterscheidung verschiedener T-Zelllinien eingesetzt. Mithilfe eines Verdrängungsexperiments konnte die spezifische Fluoreszenzemission der Sonden in den Zellen belegt werden. Untersuchungen mit zwei T-Zelllinien zeigten, dass TO-FIT-Sonden sowie terminal Cy7-markierte TO-FIT-Sonden eine erhöhte TO-Emission bei Vorhandensein der komplementären TCR-mRNA-Zielsequenz in den Zellen aufwiesen. Der terminale Cy7-Farbstoff bot mit einem zweiten Detektionskanal die Möglichkeit, die Cy7-Intensität und die vorhandene TO-Intensität ins Verhältnis zu setzen, sodass Signale von ungebundener Sonde leichter ausgeschlossen werden konnten. Dies ermöglichte eine spezifische Markierung der T-Zellen.

Es folgte die Synthese CB-markierter FIT-Sonden zur Aufklärung biologischer Fragestellungen, wie dem Verlauf einer Influenza A Infektion und die Synthese und Evaluation neuer Farbstoffe mit einem Absorptionsmaximum bei 590/596 nm. Zudem wurde der Einbau eines zyklischen PNA-Monomers bezüglich der Verbesserung von Responsivität und Helligkeit von PNA-FIT-Sonden analysiert.





## Abstract

The use of hybridization probes enables the visualization of RNA as well as DNA target sequences in cell lysates, fixed or in living cells by means of specific fluorescence emission. Seitz *et al.* developed forced Intercalation (FIT) probes used for the mRNA characterization in living cells. FIT probes contain a cyanine dye of the thiazole orange family acting as a nucleobase surrogate, which shows higher fluorescence when the probe hybridizes to the target sequence.

The synthesis of improved FIT probes as well as the systematic study on the uptake of FIT probes by living *Flp-In™ 293 T-REx™* cells was performed. Chemical and physical methods were used to study the penetration through the cell membrane. Synthesized FIT probe conjugates/aggregates as well as commercially available reagents, e.g. palmitic acid and the pore-forming enzyme Streptolysin-*O* were investigated under various conditions. Furthermore, the transfection was tested using an electroporator. The optimal transfection condition for the introduction of DNA and PNA FIT probes into *Flp-In™ 293 T-REx™* cells was achieved using Streptolysin-*O*. Multicolor live cell imaging with the simultaneous use of three different FIT probes (BO, TO and QB) against three different target sequences was performed successfully.

In addition, FIT probes were used for the differentiation between T cell lines. A displacement experiment with cells confirmed the specific fluorescence emission of the probes. Further studies with two cell lines and TO-FIT probes as well as terminal Cy7-labeled TO-FIT probes showed an increased TO emission in the presence of the complementary TCR mRNA target sequence in the cells. A second detection channel of the terminal Cy7 dye provided the advantage of comparing the Cy7- and TO-intensity ratio, thereby making it easier to exclude signals from unbound probe. This enabled the specific tagging of t cells.

This was followed by the synthesis of QB-DNA-based FIT probes for the use in various biological applications e.g. as a pan selective marker for Influenza A infection. Moreover, the synthesis and evaluation of new dyes with an absorption maximum at 590/596 nm was performed.

The incorporation of a cyclic PNA monomer next to the TO dye has also been realized to improve responsiveness and brightness in PNA-FIT probes.

Die praktischen Arbeiten wurden im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut für Chemie im Fachinstitut für Organische und Bioorganische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin von Januar 2014 bis Juni 2018 angefertigt.

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. Stand der Forschung.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2.1 Grundlagen der Fluoreszenzeigenschaften von Thiazolorange.....</b>      | <b>3</b>  |
| 2.1.1 Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung .....                                | 3         |
| 2.1.2 Thiazolorange als Fluoreszenzfarbstoff.....                              | 4         |
| <b>2.2 DNA- und RNA-Analoga.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>2.3 DNA-Festphasensynthese.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>2.4 Peptid- und PNA-Festphasensynthese .....</b>                            | <b>9</b>  |
| <b>2.5 Hybridisierungssonden.....</b>  | <b>10</b> |
| <b>2.6 mRNA-Visualisierung in lebenden Zellen .....</b>                        | <b>15</b> |
| <b>2.7 Transfektionsmethoden .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>3. Zielstellung.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>                                      | <b>24</b> |
| <b>4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen.....</b>     | <b>24</b> |
| 4.1.1 Synthese von FIT-Sonden-Peptid-Konjugaten/Aggregaten.....                | 24        |
| 4.1.2 Fluoreszenzeigenschaften von DNA-FIT-Sonden-Aggregaten.....              | 27        |
| 4.1.3 Fluoreszenzeigenschaften von FIT-Sonden-Konjugaten/Aggregaten .....      | 29        |
| 4.1.4 Zellsystem für den systematischen Vergleich der FIT-Sonden-Aufnahme..... | 32        |
| 4.1.5 Lebendzellexperimente mit FIT-Sonden-Konjugaten/Aggregaten.....          | 33        |
| 4.1.6 Elektroporationsexperimente mit FIT-Sonden.....                          | 39        |
| 4.1.7 Permeabilisierung mit Streptolysin-O .....                               | 42        |
| 4.1.8 Viabilitätsmessungen .....   | 46        |
| 4.1.9 Lebendzell-Mehrfarben-Bildgebung mit BO-, TO- und CB-FIT-Sonden.....     | 47        |
| 4.1.10 Fluoreszenzmikroskopie mit TO/JO-PNA-FIT-Sonden .....                   | 49        |
| 4.1.11 Diskussion.....   | 52        |
| <b>4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden.....</b>                                  | <b>54</b> |
| 4.2.1 Sequenzierung der CDR3-Region der TCR-mRNA.....                          | 55        |
| 4.2.2 Synthese nukleaseresistenter Sonden.....                                 | 55        |
| 4.2.3 Quantifizierung der TCR-mRNA.....  | 59        |
| 4.2.4 Optimierung der Versuchsbedingungen .....                                | 61        |
| 4.2.5 Kompetitive Hybridisierung mit FIT-Sonden und Cy7-Sonden.....            | 65        |
| 4.2.6 Zellexperimente mit Jurkat- und Molt-16-Zellen .....                     | 67        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 4.2.7      | Synthese dual-markierter FIT-Sonden.....                            | 68         |
| 4.2.8      | Stimulation der Expression des TCR.....                             | 71         |
| 4.2.9      | Zellexperimente mit Jurkat- und CCRF-CEM-Zellen .....               | 73         |
| 4.2.10     | Messungen am Durchflusszytometer.....                               | 79         |
| 4.2.11     | Diskussion.....   | 81         |
| <b>4.3</b> | <b>Verbesserte FIT-Sonden für zelluläre Anwendungen .....</b>       | <b>83</b>  |
| 4.3.1      | Vasa-CB-FIT-Sonden .....  | 83         |
| 4.3.2      | CB-FIT-Sonde als spezifischer Influenza A-Marker .....              | 86         |
| 4.3.3      | Synthese neuer Farbstoffe .....                                     | 93         |
| 4.3.4      | Einbau eines Tcyp-PNA-Monomers in TO-PNA-FIT-Sonden.....            | 97         |
| 4.3.5      | Diskussion.....   | 99         |
| <b>5.</b>  | <b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>                            | <b>101</b> |
| 5.1        | Zusammenfassung .....   | 101        |
| 5.2        | Ausblick .....  | 107        |
| <b>6.</b>  | <b>Experimenteller Teil .....</b>                                   | <b>108</b> |
| 6.1        | Allgemeine Vorschriften und Messgeräte .....                        | 108        |
| 6.1.1      | Chemische Arbeiten .....  | 108        |
| 6.1.2      | Biologische Arbeiten.....   | 114        |
| 6.1.3      | Tabelle der verwendeten Puffer .....                                | 117        |
| 6.2        | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1 .....                    | 118        |
| 6.2.1      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.1 .....                  | 118        |
| 6.2.2      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.2 und Kapitel 4.1.3..... | 123        |
| 6.2.3      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.4 .....                  | 124        |
| 6.2.4      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.5 .....                  | 126        |
| 6.2.5      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.6.....                   | 126        |
| 6.2.6      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.7 .....                  | 127        |
| 6.2.7      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.8 .....                  | 128        |
| 6.2.8      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.9 .....                  | 129        |
| 6.2.9      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.10.....                  | 129        |
| 6.3        | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2 .....                    | 130        |
| 6.3.1      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.2 .....                  | 130        |
| 6.3.2      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.3 .....                  | 131        |
| 6.3.3      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.4 .....                  | 132        |
| 6.3.4      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.5 .....                  | 133        |
| 6.3.5      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.7 .....                  | 133        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 6.3.6      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.8 .....      | 135        |
| 6.3.7      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.9 .....      | 135        |
| <b>6.4</b> | <b>Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3 .....</b> | <b>137</b> |
| 6.4.1      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3.1 .....      | 137        |
| 6.4.2      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3.2 .....      | 138        |
| 6.4.3      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3.3 .....      | 140        |
| 6.4.4      | Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3.4 .....      | 143        |
| <b>7.</b>  | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                      | <b>145</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Literaturverzeichnis.....</b>                        | <b>148</b> |
| <b>9.</b>  | <b>Anhang.....</b>                                      | <b>153</b> |
| 9.1        | Anhang zu Kapitel 4.1.....                              | 153        |
| 9.2        | Anhang zu Kapitel 4.2.....                              | 166        |
| 9.3        | Anhang zu Kapitel 4.3.....                              | 210        |



# 1. Einleitung

Die Untersuchung dynamischer Prozesse, wie der Genexpression, der Informationsweitergabe innerhalb von Organismen oder der temporären Lokalisation von RNA setzt Experimente an lebenden Zellen voraus.<sup>[1]</sup> Die DNA (*deoxyribonucleic acid*) und RNA (*ribonucleic acid*) sind maßgebend für diese Prozesse und aus diesem Grund auch die am häufigsten in die Zelle eingebrachten und untersuchten Moleküle in den letzten Jahrzehnten.<sup>[2]</sup>

Die heutigen Methoden machen es leicht DNA und RNA synthetisch herzustellen, zu sequenzieren und zu analysieren. Es können modifizierte Oligonukleotide in Zellen eingesetzt und anschließend deren Auswirkung auf die Hybridisierung,<sup>[3]</sup> die Faltung und die Konformationsänderungen von Nukleinsäuren sowie deren Einfluss in der Entwicklungsbiologie,<sup>[4]</sup> bei viralen Infektionen,<sup>[5]</sup> bei der Wechselwirkung von Proteinen und Nukleinsäuren<sup>[6]</sup> und der RNA-Editierung untersucht werden.<sup>[7]</sup> Fluorogene Hybridisierungssonden, wie z.B. die FIT-Sonden, erlauben es DNA- und RNA-Moleküle in lebenden Zellen in Echtzeit darzustellen.<sup>[8]</sup> Eine zentrale Rolle bei der Bildgebung spielt die Helligkeit der Sonden, durch die das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bestimmt wird. Zur Steigerung der Helligkeit der hier verwendeten FIT-Sonden werden *locked nucleic acid* (LNA)-Bausteine in die Sequenz eingebaut. Diese verfestigen das Rückgrat der Doppelhelix und führen durch Hinderung der Rotation des Farbstoffes zur Steigerung der Emissionsquantenausbeuten.<sup>[3]</sup> Durch die Verwendung von 2'-O-Me-Bausteinen kann zudem eine Resistenz gegenüber Nukleasen sichergestellt werden.<sup>[3]</sup>

Entscheidend für den Erfolg der Messungen in lebenden Zellen ist die Effizienz der Transfektion und die Viabilität der Zellen. Nur unter optimalen Bedingungen werden die zu untersuchenden Prozesse in der Zelle nicht beeinflusst und die Reproduzierbarkeit der Experimente gewährleistet. Hierbei gibt es eine große Auswahl an Möglichkeiten der Transfektion, wie der Mikroinjektion,<sup>[9]</sup> der Elektroporation,<sup>[10]</sup> der Verwendung von zellpenetrierenden Peptiden<sup>[11]</sup> oder porenbildenden Enzymen.<sup>[12]</sup> Jedoch haben diese Methoden ihre Schwachstellen bezüglich bestimmter Zelllinien oder der zu transportierenden Moleküle und müssen dementsprechend für jede Anwendung optimiert werden.<sup>[2d]</sup>

Genauso wichtig wie das Einbringen in die Zellen ist das anschließende Auslesen der Informationen. Eine geeignete und weit verbreitete Methode der Charakterisierung ist das Auslesen durch Fluoreszenzmikroskopie.<sup>[13]</sup> Die Fluoreszenzmikroskopie macht bereits kleinste Strukturen sichtbar und benötigt dafür nur wenig Substanz.

## 1. Einleitung

---

Die relativ geringe Toxizität der fluoreszenten Sonden und die geringe Beeinträchtigung der Mobilität, durch den Einbau kleiner fluoreszenter Moleküle, macht diese Methode ideal für den Einsatz in dynamischen Prozessen von Zellen.<sup>[14]</sup>



## 2. Stand der Forschung

### 2.1 Grundlagen der Fluoreszenzeigenschaften von Thiazolorange

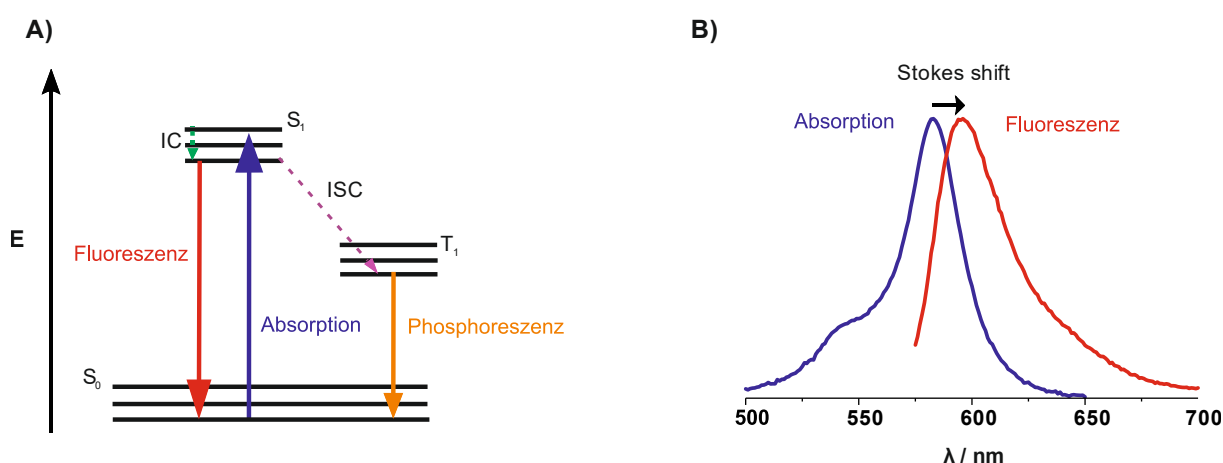
#### 2.1.1 Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung

Die Fluoreszenzspektroskopie kann sowohl zur quantitativen als auch zur qualitativen Untersuchung von Substanzen genutzt werden.<sup>[15]</sup> Die Fluoreszenzmikroskopie wird dabei zur Analyse dynamischer Prozesse in Zellen eingesetzt.<sup>[15-16]</sup> Selbst wenn die Struktur zu klein ist um im Lichtmikroskop aufgelöst zu werden, so ist die Fluoreszenzemission ausreichend um diese zu visualisieren. Hierbei ist die Verwendung von fluoreszierenden Oligonukleotiden weit verbreitet, da sich Quantenausbeute, Lebensdauer, *Stokes-shift* sowie die molare Absorption durch die Wechselwirkung mit der Umgebung ändern können.<sup>[17]</sup>

Während des Prozesses der Fluoreszenz wird zunächst das Molekül durch Absorption von Energie in den angeregten Zustand ( $S_1$ ) versetzt. Durch Wechselwirkungen mit umliegenden Molekülen kommt es zur strahlungslosen Umwandlung der Energie (*internal conversion*, IC). Das Molekül gelangt so in den niedrigsten vibronischen Zustand des  $S_1$ . Die Zeit des Aufenthalts im angeregten Zustand wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet und liegt bei einigen Nanosekunden. Der Übergang vom niedrigsten vibronischen Zustand ( $S_1$ ) zurück in den Grundzustand ( $S_0$ ) des Moleküls, wird durch Emission von Strahlung (Fluoreszenz) begleitet. Das angeregte Molekül kann zudem durch eine Singulett-Triplett-Umwandlung (*intersystem crossing*, ISC) in den angeregten Triplett-Zustand ( $T_1$ ) übergehen (Abbildung 2.1.1 A). Die Relaxation aus  $T_1$  zu  $S_0$  (Phosphoreszenz) ist symmetrieverboten, wodurch der Übergang deutlich seltener stattfindet als von  $S_1$  zu  $S_0$ . Verursacht durch die bereits stattgefundenen Umwandlung der Energie beim Übergang in niedrigere vibronische Zustände, kommt es zum sogenannten *Stokes-shift*, bei dem sich die Wellenlänge zwischen Absorption und Emission verschiebt. Folglich ist die abgestrahlte Energie der Fluoreszenz geringer als die bei der Absorption aufgenommene (Abbildung 2.1.1 B).

Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi$  gibt das Verhältnis von absorbierten zu emittierten Photonen wieder und beschreibt damit das Verhältnis der Emission zu den strahlungslosen Relaxationsprozessen.<sup>[15]</sup>

## 2.1 Grundlagen der Fluoreszenzeigenschaften von Thiazolorange



**Abbildung 2.1.1** A) Schematische Darstellung des Jablonski-Diagramms. B) Schematische Darstellung des *Stokes-shifts*.

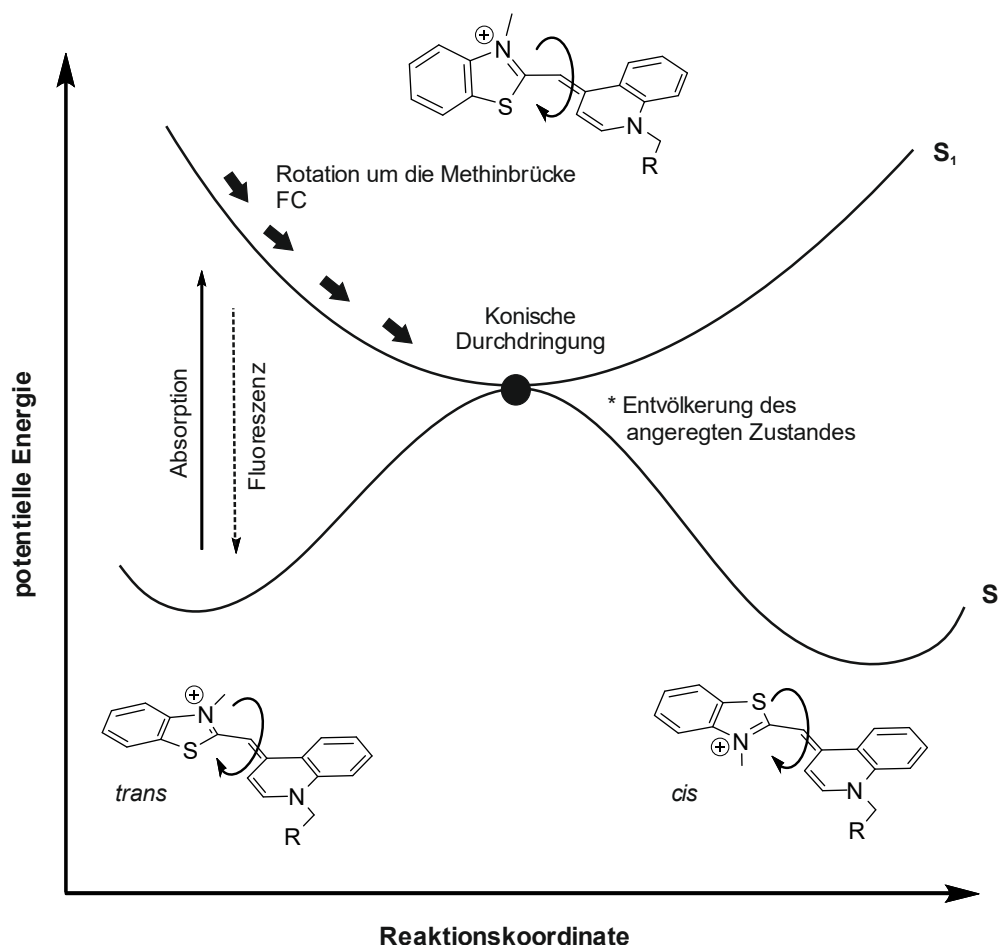
Für die Fluoreszenz spielen zeitgleich verschiedene Löschprozesse (*quenching*) eine wichtige Rolle. Zum einen existiert die Stoßlöschung, auch dynamisches Fluoreszenzlöschen genannt, bei der die Energie eines angeregten Fluorophors durch den Zusammenstoß mit einem Fluoreszenzlöcher übertragen bzw. gelöscht wird. Verursacht durch verstärkte Molekularbewegung ist bei höherer Temperatur eine erhöhte Fluoreszenzlöschung sichtbar. Eine andere Art der Löschung ist das statische Fluoreszenzlöschen, welches durch Bildung eines Fluorophor-Fluoreszenzlöcher-Komplexes hervorgerufen wird. Anders als beim dynamischen Fluoreszenzlöschen, wird die Fluoreszenzlöschung durch eine erhöhte Temperatur verringert, da es zur Destabilisierung des Komplexes kommt. Weiterhin kann eine Energieübergabe durch FRET (Förster-Resonanz-Energie-Transfer) stattfinden, wobei die Energie von einem angeregten Donormolekül auf ein Akzeptormolekül strahlungslos übertragen wird.<sup>[15, 18]</sup>

### 2.1.2 Thiazolorange als Fluoreszenzfarbstoff

Die eben beschriebenen Prozesse spielen bei der Funktionsweise von fluoreszenten Hybridisierungssonden eine wichtige Rolle. Die von Seitz *et al.* entwickelten FIT-Sonden stellen PNA- und DNA-Hybridisierungssonden dar, die einen Cyaninfarbstoff aus der TO-Familie als Nukleobasensurrogat in der Sequenz aufweisen. Der Fluoreszenzfarbstoff kann in der nicht-hybridisierten Form der DNA frei um die Methinbrücke rotieren. Bei der Hybridisierung mit einer komplementären Zielsequenz, wird die Rotation über die Methinbrücke gehindert und die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz abgegeben. Abbildung 2.1.2. verdeutlicht das Schema der Anregung und Entvölkerung des angeregten Zustands von Thiazolorange. Bei der Anregung im Einzelstrang wird nur eine geringe Fluoreszenz durch die rasche Entvölkerung des angeregten  $S_1$ -Zustandes beobachtet. Die Entvölkerung findet durch eine symmetrische

## 2.1 Grundlagen der Fluoreszenzeigenschaften von Thiazolorange

Streckung, eine torsionale Drehung und eine darauffolgende asymmetrische Streckung in den  $S_0$ -Zustand statt. Hierbei wird die Frank-Condon-Region entlang der Energiehyperfläche, durch Drehung der Methinbrücke, verlassen. Bei Erreichen eines Torsionswinkels von  $90^\circ$  kommt es zur konischen Durchdringung des  $S_1$ - und  $S_0$ -Zustands, gefolgt von einer internen Konversion zurück zum thermischen Gleichgewicht. Ist diese Torsion um die Methinbrücke möglich, so relaxiert der Farbstoff strahlungslos. Bei erhöhter Viskosität der Umgebung, durch starke  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen mit den benachbarten Nukleobasen, wird die Rotation um die Methinbrücke gehindert. Dies begünstigt die Relaxation über die Fluoreszenzemission anstatt der internen Konversion. <sup>[19]</sup>



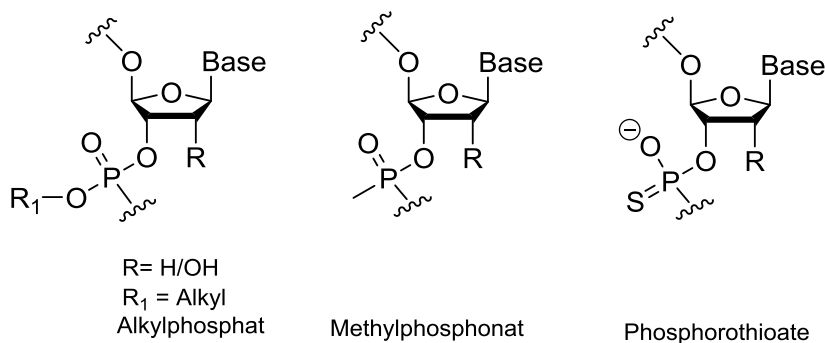
**Abbildung 2.1.2** Schematische Darstellung der Entvölkerung des angeregten Zustands bei Rotation um die Methinbrücke (durchgezogene Kurve). Fluoreszenz tritt nicht auf, da sich TO aus der Franck-Condon-Region (FC) entfernt. An der konischen Durchdringung tritt anschließend interne Konversion auf. Bei der Interkalation durch starke  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen, wird die Rotation auf dem Weg zur konischen Durchdringung gehindert. Die Energie wird nun als Fluoreszenz (gestrichelter Pfeil) abgegeben.

### 2.2 DNA- und RNA-Analoga

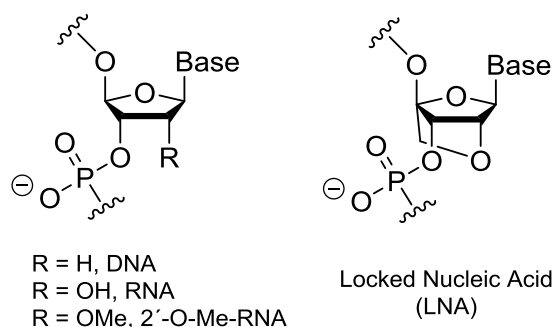
Für eine sequenzspezifische Hybridisierung mit den Zielsequenzen in lebenden Zellen muss sowohl eine hohe Affinität gegenüber der Zielsequenz als auch Stabilität gegenüber Nukleasen gewährleistet sein. Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit unterschiedlichste Modifikationen von Nukleinsäuren hergestellt und diese auf ihre Stabilität gegenüber dem Nukleaseverdau getestet.<sup>[20]</sup> Es wurden Änderungen am Phosphatrest, an der Ribose oder an den Nukleobasen vorgenommen.<sup>[21]</sup> Bei den Modifikationen des Phosphatrests kann es sich um Alkylphosphate,<sup>[22]</sup> Methylphosphonate<sup>[23]</sup> oder Phosphorothioate<sup>[24]</sup> handeln. Das Sauerstoffatom in der Phosphatdiesterbrücke ist jeweils gegen ein Schwefelatom, eine Methyl- oder eine Alcoxy-Gruppe ausgetauscht (Abbildung 2.2). Solche Bausteine kommen oft als Antisense-Oligonukleotide zur Anwendung, da sie resistent gegen den Abbau durch Nukleasen sind. Allerdings weisen sie eine geringere Affinität für RNA als DNA auf.<sup>[25]</sup> Die gängigste Modifikation an der Ribose ist die 2'-O-Me-Modifikation.<sup>[26]</sup> Ein weiteres Beispiel der 2'-O-Alkylierung ist die LNA (*locked nucleic acid*). Hierbei ist die C<sub>4</sub>-Position der Ribose mit der 2'-Hydroxygruppe durch eine Methyleneneinheit verbrückt (Abbildung 2.2).<sup>[27]</sup> Beide Modifikationen führen zu einem stabileren Duplex und somit zu einer höheren Schmelztemperatur. Die LNA kann sogar eine Erhöhung der Schmelztemperatur um 2 - 9 °C pro Monomer bewirken.<sup>[27-28]</sup> Die zusätzliche Nukleaseresistenz beider Bausteine macht sie für die Anwendung in Lebendzell-Experimenten besonders interessant.<sup>[29]</sup> Bei der GNA (Glykolnukleinsäure)<sup>[30]</sup> und der PNA (Peptidnukleinsäure)<sup>[31]</sup> wird vollständig auf das zyklische System im Rückgrat verzichtet. Die PNA ähnelt der DNA nur noch durch die Verwendung gleicher Basen. Ansonsten ähnelt es durch das peptidische Rückgrat, bestehend aus verknüpften Aminoethylglycin-Bausteinen, den Peptiden. Die PNA bildet weitaus stabilere Duplexe mit der DNA und RNA aus als die DNA selbst. Durch ihre hydrophobe Eigenschaft, das neutrale Rückgrat und die damit ausbleibende Ladungsabstoßung, kommt es zu einer erhöhten Duplexstabilität. Die zusätzliche Nukleaseresistenz macht sie für die Anwendung in biologischen Experimenten ebenfalls geeignet.<sup>[32]</sup>

## 2.3 DNA-Festphasensynthese

### Modifikationen am Phosphatrest



### Modifikationen an der Ribose



### Modifikationen ohne zyklisches System

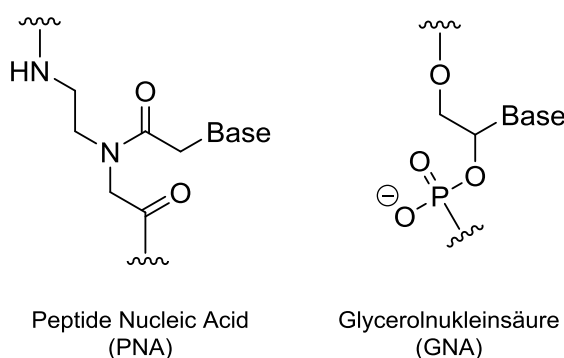


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung von DNA- und RNA-Analoga.

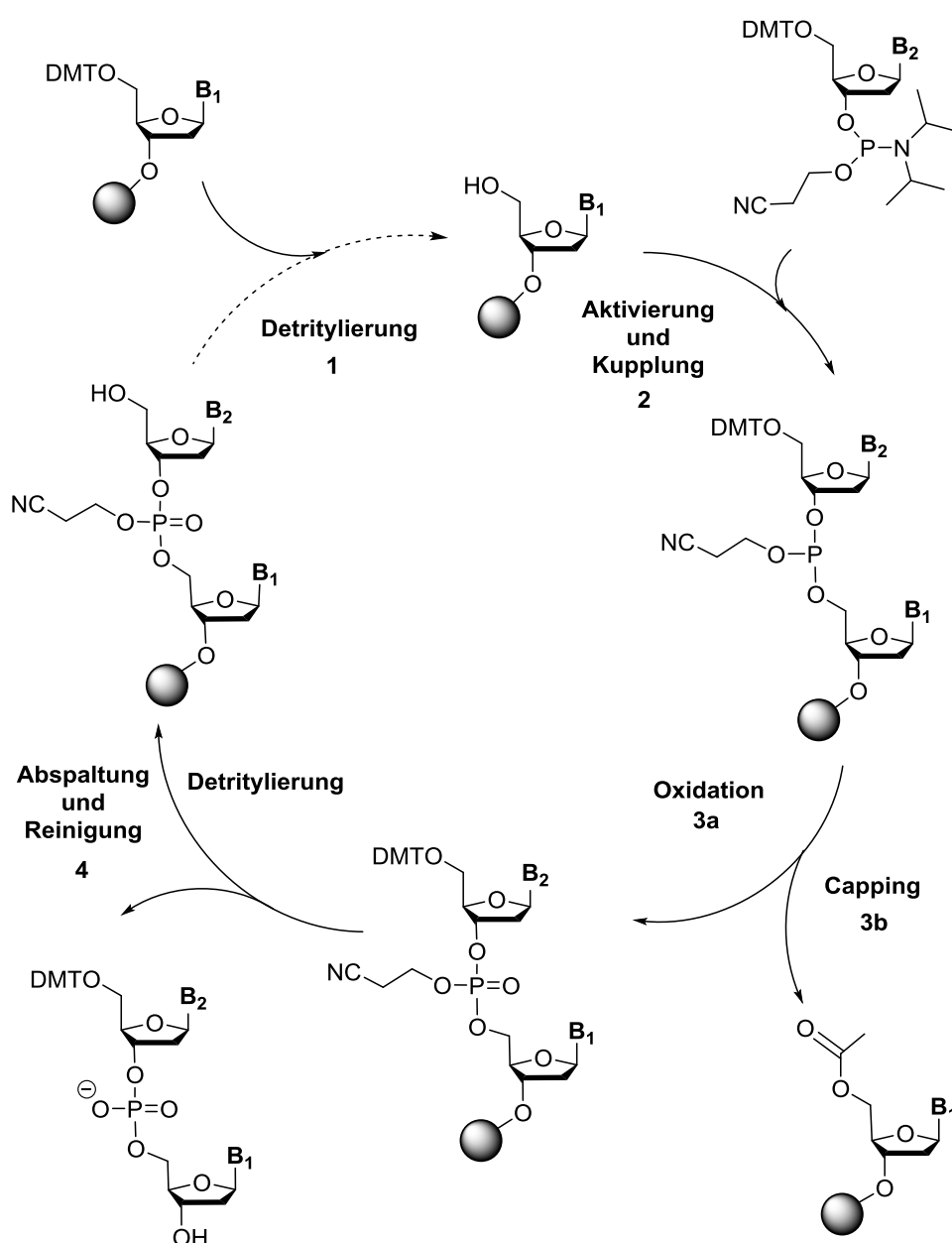
## 2.3 DNA-Festphasensynthese

Die Herstellung von DNA-FIT-Sonden erfolgt durch die DNA-Festphasensynthese (Abbildung 2.3). 1980 wurde von Caruthers *et al.* eine Methode zur Kupplung sehr reaktiver und stabiler Phosphoramidite für die DNA-Festphasensynthese entwickelt. Diese stellten im Gegensatz zu den zuvor genutzten Chloriditen lagerbare Stoffe dar.<sup>[33]</sup> Ein Vorteil der Synthesestrategie ist der Überschuss an Reaktanden, der eine kurze Reaktionszeit begünstigt. Obendrein sind Verunreinigungen und überschüssige Reaktanden zwischen jeder Kupplung leicht zu entfernen. Der Syntheseansatz bei der Festphasensynthese kann vom nanomolaren Bereich für analytische Anwendungen bis zum molaren Bereich für therapeutische Zwecke variieren. Die Synthese lässt sich zudem problemlos automatisieren.<sup>[34]</sup> Als feste Phase wird ein CPG (*controlled pore glass*), ein rigides und poröses Glas mit einer Porengröße von 500 - 2000 Å, verwendet. Das CPG ist bereits

## 2.3 DNA-Festphasensynthese

meistens mit einem Nukleotid beladen. Die Synthese findet in der Regel vom 3′- zum 5′-Ende statt. Der umgekehrte Fall ist ebenfalls möglich, aber weit weniger gebräuchlich.

Die Synthese beginnt mit der Detritylierung der DMT-Schutzgruppe am Sauerstoff des 5′-Kohlenstoff-Atoms (**1**). Dies führt zur Reaktivierung des Monomers.<sup>[35]</sup> Das zu kuppelnde Phosphoramidit wird zunächst mit Tetrazol bzw. einem Tetrazolderivat in Acetonitril aktiviert und kann daraufhin mit der freien 3′-Hydroxygruppe, der auf dem CPG verankerten Nukleobase, reagieren (**2**).<sup>[36]</sup> Es entsteht ein Phosphittriestern. Die nicht umgesetzten 5′-Hydroxygruppen reagieren anschließend mit Essigsäureanhydrid und *N*-Methylimidazol ab (Capping, **3b**), um für die nächste Kupplung im Zyklus nicht mehr zugänglich zu sein. Andernfalls würden unterschiedlich lange Sequenzen mit fehlenden Basen bzw. falscher Basensequenz entstehen.

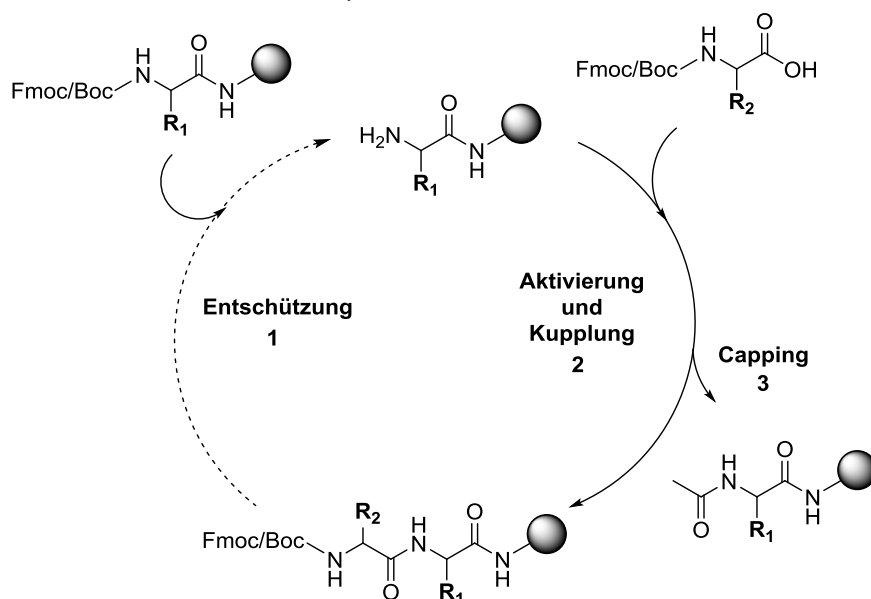


**Abbildung 2.3** Schematische Darstellung der DNA-Festphasensynthese. B = Base.

Der Phosphittriesther wird durch die Behandlung mit Iod, Wasser und Pyridin zum Phosphorsäuretriesther oxidiert (**3a**). Anschließend beginnt der nächste Zyklus und die oben genannten Schritte werden abermals wiederholt. Alternativ kann nach Fertigstellung der Sequenz die Abspaltung mit Ammoniak von der festen Phase und das Entfernen der Cyanoethylgruppen (**4**) erfolgen. Unter diesen Bedingungen werden auch die acetylierten Abbruchsequenzen verseift. Mittels der HPLC-Aufreinigung können diese anschließend durch die unterschiedliche Polarität voneinander abgetrennt werden.

### 2.4 Peptid- und PNA-Festphasensynthese

Die Peptide und PNA-FIT-Sonden werden durch das 1963 von Merrifield entwickelte Konzept der Peptid-Festphasensynthese (Abbildung 2.4) hergestellt.<sup>[37]</sup> Als feste Phase dient in diesem Fall ein quellbares Polystyrol-Harz. Es liegen zwei Möglichkeiten der Schutzgruppenstrategie vor, die Fmoc (Fluorenylmethoxycarbonyl)/Bhoc (Benzhydryloxycarbonyl)-Strategie oder die Boc (*tert*-Butyloxycarbonyl)/Cbz-Benzylloxycarbonyl-Strategie. Zu Beginn der Synthese wird zunächst die Schutzgruppe am Harz entfernt (Entschützung, **1**) und mit dem aktivierten C-Terminus der Aminosäure (AS), unter Bildung einer Amidbindung, gekuppelt (**2**). Nach jeder Kupplung werden die Aminfunktionen, welche nicht mit dem aktivierten AS-Monomer abreagiert sind, mit Essigsäureanhydrid acetyliert (Capping, **3**). So werden diese für die nächste Kupplung blockiert. Die jeweilige Schutzgruppe am N-Terminus der gekuppelten Aminosäure wird unter basischen Bedingungen (Fmoc-Strategie) oder unter sauren Bedingungen (Boc-Strategie) entschützt und mit dem C-Terminus der nächsten AS verknüpft.



**Abbildung 2.4** Schematische Darstellung der Peptid- bzw. PNA-Festphasensynthese.

Der Zyklus wird so lange wiederholt bis die gewünschte Peptidsequenz hergestellt ist. Anschließend wird das Peptid mit einer starken Säure, wie Trifluoressigsäure (TFA), vom Harz und den restlichen Schutzgruppen befreit und mittels HPLC aufgereinigt.<sup>[38]</sup>

## 2.5 Hybridisierungssonden

Wie bereits angemerkt können modifizierte Oligonukleotide für den Nachweis von Interaktionen zwischen Oligonukleotid und Protein, bzw. in der Aufklärung biochemischer Prozesse, zum Einsatz kommen.<sup>[39]</sup> Hierbei eignen sich besonders Hybridisierungssonden mit mindestens einem Fluoreszenzfarbstoff und gegebenenfalls einem Fluoreszenzlöcher (*quencher*).<sup>[40]</sup> Einige Fluoreszenzfarbstoffe reagieren sehr sensibel auf ihre direkte Umgebung, was in einer Änderung der Fluoreszenz beobachtet werden kann. Bei der Anwendungsart von Hybridisierungssonden unterscheidet man zwischen heterogenen und homogenen Methoden. Bei der heterogenen Methode wird die Zielsequenz an einer festen Phase immobilisiert und die Sonde anschließend hinzugegeben. Durch Waschen der festen Phase können nicht-hybridisierte Sonden entfernt werden (Bsp. FISH, *fluorescence in situ hybridization*).<sup>[40b]</sup> Im Fall der homogenen Methode liegen alle beteiligten Spezies, sprich Zielsequenz und Sonde, in der gleichen Phase vor, wodurch ein Waschschriff nicht möglich ist (Bsp. Lebendzell-Markierung).<sup>[41]</sup> Die im Folgenden beschriebenen Hybridisierungssonden können in beiden Methoden eingesetzt werden. Die Konzepte der Sonden lassen sich unabhängig von ihrer Funktionsgrundlage anhand zweier wesentlicher Parameter kennzeichnen, der Fluoreszenzintensität von ungebundener ( $I_0$ ) und gebundener Sonde ( $I$ ). Es wird zudem ein großer Fluoreszenzanstieg ( $I/I_0$ ) bei Hybridisierung angestrebt.

### A) *Molecular Beacons*

Die wohl gängigsten Hybridisierungssonden für *in vitro* und *in vivo* Messungen sind die von Tyagi und Kramer 1996 entwickelten *molecular beacons* (MBs).<sup>[42]</sup> Diese bestehen aus einer ca. 20 - 40 Nukleotid langen Sequenz. Dabei bilden 5 - 8 Basen den Stamm und die restlichen die Schleife. Die Schleife ist zur Zielsequenz komplementär. An deren 3'-Ende befindet sich ein Fluorophor und am 5'-Ende ein Fluoreszenzlöcher (*quencher*). Bei räumlicher Nähe, also im geschlossenen Zustand der Haarnadelstruktur, wird die Fluoreszenz direkt gelöscht, sodass kein detektierbares Signal vorliegt. Befindet sich jedoch die zur Schleife komplementäre Zielsequenz in der Nähe des MB, so öffnet sich diese und es kommt zur Hybridisierung. Daraus folgt, dass sich der räumliche Abstand von Fluorophor und Fluoreszenzlöcher vergrößert, was in einem Anstieg der Fluoreszenz



resultiert (Abbildung 2.5.1 A).<sup>[43]</sup> MBs können sowohl in fixierten, lebenden Zellen als auch in der PCR verwendet werden.<sup>[44]</sup> Hierfür ist jedoch ein optimales Design notwendig, da es durch temperaturbedingtes Öffnen der Haarnadelstruktur zu falsch-positiven Signalen kommen kann. Um die Hintergrundfluoreszenz der MBs abzusenken wurden *excimer molecular beacons* entwickelt. Dies sind doppelt markierte Sonden, die in der geschlossenen Haarnadelstruktur einen stabilen Donor-Akzeptor-Komplex bilden und somit keine Fluoreszenz emittieren. Durch die räumliche Trennung beim Öffnen nimmt die Fluoreszenzlöschung ab, wodurch ein Fluoreszenzanstieg resultiert.<sup>[45]</sup> Zugleich existieren Weiterentwicklungen der MBs, wie die *wavelength-shifting* MBs,<sup>[46]</sup> bei welchem ein Fluoreszenzlöcher und zwei Fluorophore vorliegen. Diese emittieren beim Öffnen der Haarnadelstruktur über FRET. Dual-FRET MBs, die aus einem separaten Donor-MB und einem Akzeptor-MB bestehen, können durch nebeneinanderliegende Hybridisierung mit der Zielsequenz über FRET interagieren.<sup>[41b]</sup> Die *ratiomeric bimolecular beacons*<sup>[47]</sup> bestehen aus einem kurzen Fluorophor-markierten und einem einseitig verlängerten Stamm. Dieser hybridisiert mit einem zweiten Oligomer. Da der kurze Stamm mit einem Referenzfarbstoff versehen ist, kann dieser zur Quantifizierung der Hybridisierungssonde verwendet werden.<sup>[48]</sup> *Quencherfree* MBs besitzen keinen Fluoreszenzlöcher in der Struktur.<sup>[49]</sup> Bei den Quantenpunkt (*quantum dot*, QD) basierten MBs dient der QD als Fluorophor, wobei die Fluoreszenzlöchersequenz durch die Zielsequenz am QD ausgetauscht wird.<sup>[50]</sup>

### B) ECHO-Sonden

ECHO-Sonden wurden von Okamoto *et al.* entwickelt und basieren auf der Aggregation zweier TO-Farbstoffe. Beide sind an ein Pyrimidin-Nukleotid gebunden. Im Einzelstrang wird die Fluoreszenz durch die Bildung eines Excimers (*excited dimer*) gelöscht. Hybridisiert die Sonde mit einer Zielsequenz, so interagieren die beiden Fluorophore durch Aggregation mit der DNA und emittieren Fluoreszenz (Abbildung 2.5.1 B).<sup>[51]</sup> Durch Verwendung von 2'-O-Me-RNA oder LNA können ebenfalls nukleaseresistente Sonden hergestellt werden.<sup>[52]</sup> Besonders hohe Fluoreszenzanstiege resultieren bei einem gehäuften Aufkommen von A und T.<sup>[53]</sup>

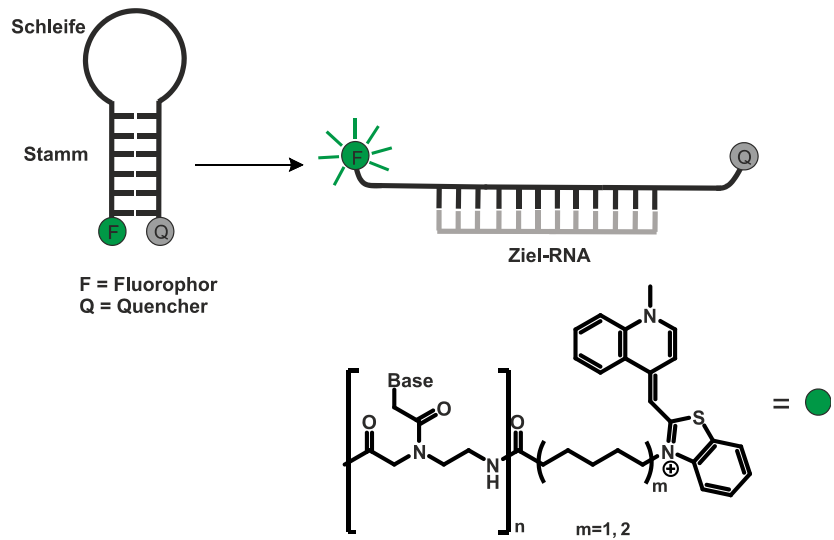
### C) Traffic Lights

Die von Wagenknecht *et al.* entwickelten *traffic lights* sind Hybridisierungssonden mit einem in die Struktur integriertem Thiazolorange und Thiazolrot.<sup>[54]</sup> Der Farbstoff wird hierbei als Nukleotidsurrogat in die Sequenz eingebaut. Bei der Einfachmarkierung mit nur einem Farbstoff, bleibt eine hohe Responsivität aus. Deswegen wurde eine Kombination von zwei TO-Farbstoffen

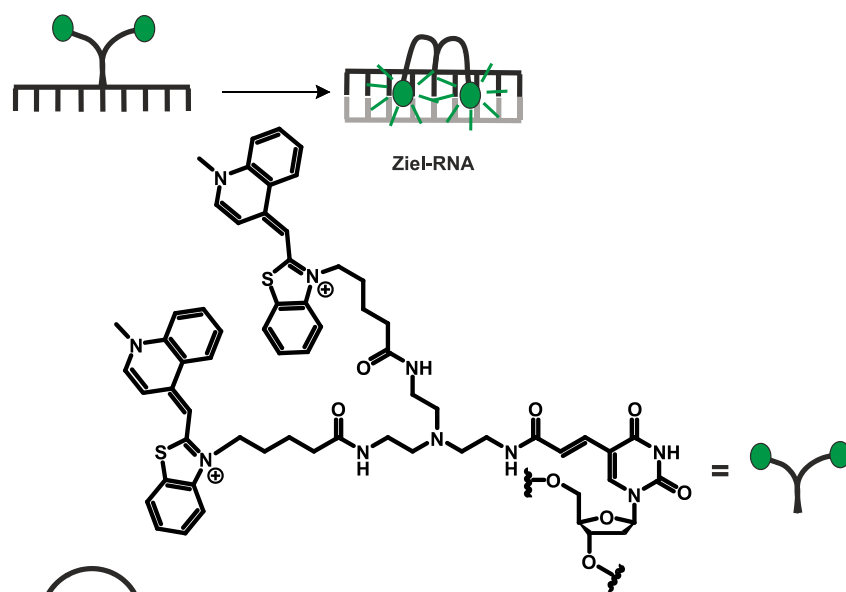
oder von einem TO- und einem TR-Farbstoff entwickelt. Im geschlossenen Zustand der Sonde bilden die zwei Farbstoffe (TO) ein Aggregat, auch Excimer genannt. Die dadurch entstehende Rotverschiebung führt dazu, dass im detektierten Wellenlängenbereich kaum Signal vorhanden ist. Bei der Kombination von TO und TR bewirkt ein FRET nur eine geringere Emission des TO, da die Energie vom TO direkt an das TR weitergegeben wird. Öffnet sich die Haarnadelstruktur, so entfernen sich die beiden Farbstoffe räumlich voneinander und emittieren dadurch Licht der TO-Wellenlänge (Abbildung 2.5.1 C). Der bei der Hybridisierung von einer TO-TR-Kombination entstehende Farbwechsel von 660 nm (rot) zu 530 nm (grün) ist hierbei namensgebend für die *traffic lights*. Eine TR- und TO-markierte siRNA konnte bereits in lebenden Zellen visualisiert werden.<sup>[55]</sup>

## 2.5 Hybridisierungssonden

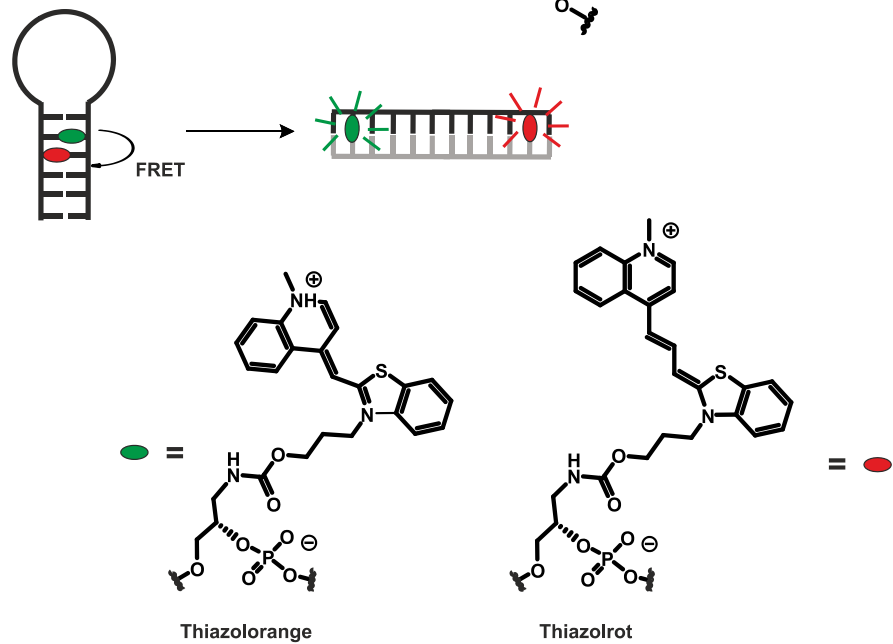
### A) *Molecular Beacons*



### B) *ECHO-Sonden*



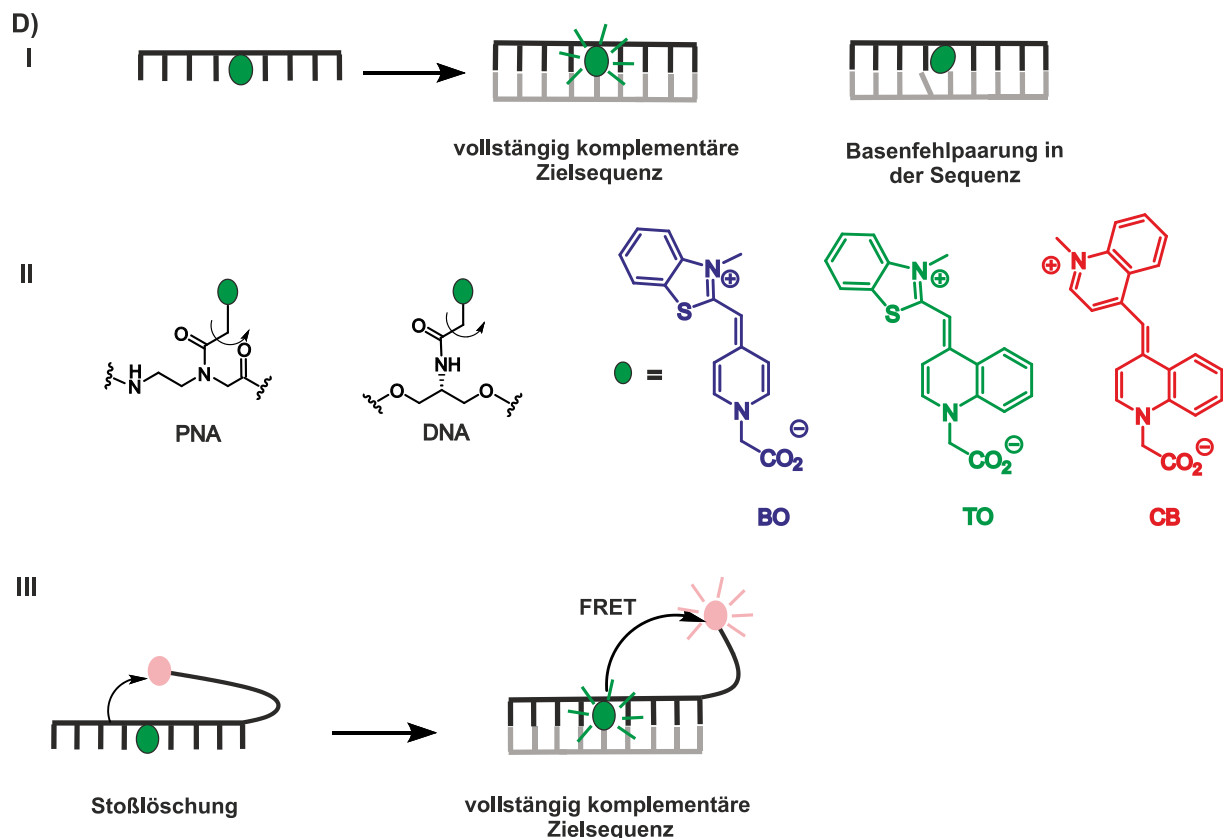
### C) *Traffic Lights*



**Abbildung 2.5.1** Schematische Darstellung vom Aufbau und der Funktionsweise einiger ausgewählter Hybridisierungssonden. A) *Molecular Beacons*, B) *ECHO-Sonden* und C) *Traffic Lights*. F = Fluorophor, Q = Quencher, FRET = Förster-Resonanz-Energie-Transfer.

### D) FIT-Sonden

Seitz *et al.* entwickelten das Konzept der erzwungenen Interkalation von Thiazolorange (FIT). In den FIT-Sonden dient ein Thiazolorange oder ein anderer Cyaninfarbstoff als Nukleobasenersatz. Dieser ist in der Sequenz fest eingebaut und kann im Einzelstrang über die Methinbrücke frei rotieren. Durch Hybridisierung der Sonde mit einer komplementären Zielsequenz, wird die Rotation des Farbstoffes um die Methinbrücke gehindert. Die aufgenommene Energie wird in Form von Fluoreszenz abgegeben. Durch ein Basenfehlpaar in direkter Nachbarschaft zum Farbstoff, wird die Rotation nicht weiter gehindert und die aufgenommene Energie strahlungslos abgegeben (Abbildung 2.5.2 D I). FIT-Sonden können sowohl als PNA- als auch DNA/RNA-Sonden hergestellt werden (Abbildung 2.5.2 D II).



**Abbildung 2.5.2 D I)** Schematische Darstellung der FIT-Sonden. Bei Vorhandensein der komplementären Zielsequenz und der damit einhergehenden Hybridisierung mit der Sonde, wird die Rotation des Farbstoffes gehindert und die aufgenommene Energie verstärkt in Form von Fluoreszenz emittiert. Bei einer Basenfehlpaarung in direkter Nachbarschaft zum Farbstoff, kann dieser weiterhin um die Methinbrücke rotieren, wodurch die Fluoreszenz nur sehr schwach emittiert wird. II) Einbau der Farbstoffe in das Rückgrat der PNA als auch DNA und die Strukturformeln von BO, TO und CB. III) Schematische Darstellung der von Socher *et al.* entwickelten dualen FIT-Sonden.

PNA-FIT-Sonden wurden bereits erfolgreich in der Echtzeit-PCR und der quantitativen PCR verwendet.<sup>[19b, 56]</sup> Der Vorteil der FIT-Sonden gegenüber anderen Hybridisierungs sonden ist hierbei die hohe Toleranz gegenüber einem großen Temperaturbereich.<sup>[19b, 57]</sup> Die PNA-Sonden konnten zudem zur Detektion viraler mRNA mittels zweier Farbstoffe in lebenden Zellen

eingesetzt werden.<sup>[58]</sup> Des weiteren veränderten Socher *et al.* das FIT-Sonden-Konzept durch den Einbau eines zweiten, terminalen Farbstoffes (Abbildung 2.5.2 D III). Die dualen-Sonden zeigten enorme Responsivitäten mit einem bis zu 450-fachen Fluoreszenzanstieg.<sup>[58]</sup> Das Prinzip basiert auf den hydrophoben Eigenschaften der PNA und der daraus resultierenden Bildung von intramolekularen Aggregaten, bzw. deren Fluoreszenzlöschung im Einzelstrang. Hybridisiert die dual-markierte Sonde, so entfernen sich die beiden Farbstoffe räumlich voneinander. Durch einen Energietransfer (FRET) zwischen beiden Farbstoffen können so hohe Fluoreszenzanstiege erreicht werden.

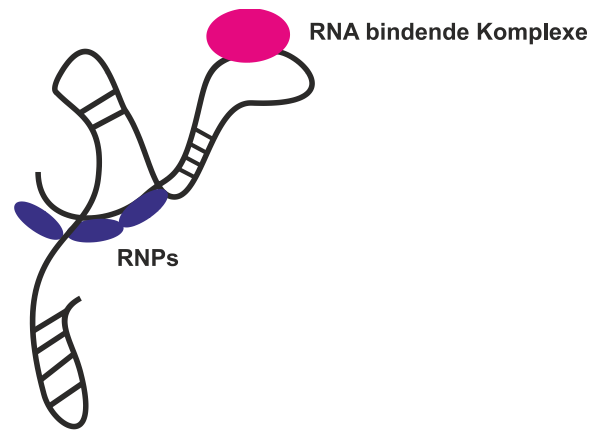
Das FIT-Sonden-Konzept wurde anschließend auf DNA-Bausteine übertragen. Die Fluoreszenzeigenschaften der DNA-FIT-Sonden wurden von Bethge *et al.* durch Anpassung der Länge des Serinol-Linkers optimiert. Dieser weist in seiner kurzen Form und der Anbindung über den Chinolin-Stickstoff die besten Eigenschaften auf.<sup>[19a]</sup> Eine Veränderung zu längeren Linkern führte zum Verlust der Responsivität. Ein weiterer Vorteil der DNA-FIT-Sonden ist die weniger zeitintensive und kostengünstigere Synthese im Vergleich zur PNA. Hövelmann *et al.* optimierten zudem die Nukleaseresistenz der DNA-FIT-Sonden durch Verwendung von 2'-O-Me-RNA-Bausteinen. Ein in direkter Nachbarschaft zum Farbstoff verwendetes LNA-Monomer resultiert in einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität, durch Stabilisierung der Duplexstruktur nach Hybridisierung.<sup>[53a]</sup> Die Sonden konnten bereits in der Lebendzell-Bildgebung von *Oskar*-mRNA in Oozyten der *Drosophila Melanogaster* eingesetzt werden.<sup>[3]</sup>

## 2.6 mRNA-Visualisierung in lebenden Zellen

Quantitative Methoden zur Messung von *in vitro* Genexpressionen, wie z.B. PCR (*polymerase chain reaction*) oder DNA-Chip-Technologien, sind wichtige Methoden in der Biologie.<sup>[59]</sup> Mit diesen Methoden erhält man jedoch nur Informationen innerhalb einer Zellpopulation oder einer einzelnen Zelle. Die Informationen zur genauen Lokalisation bleiben jedoch aus.<sup>[60]</sup> FISH ist eine nützliche Methode um das Vorhandensein oder Ausbleiben von Zielsequenzen in fixierten Zellen zu detektieren oder ihre momentane Lokalisation zu bestimmen.<sup>[61]</sup> Da überschüssige Sonde nach der Fixierung problemlos gewaschen werden kann ist die Hintergrundfluoreszenz der Sonden vernachlässigbar. Für die Visualisierung eines dynamischen Prozesses über die Zeit sind jedoch Messungen innerhalb einer lebenden Zelle notwendig.<sup>[62]</sup>

Mit fluorogenen Sonden ist es möglich Transkription, Transport und Verteilung von mRNA in lebenden Zellen mit zeitlicher und räumlicher Auflösung zu detektieren.<sup>[25]</sup> Dafür müssen die

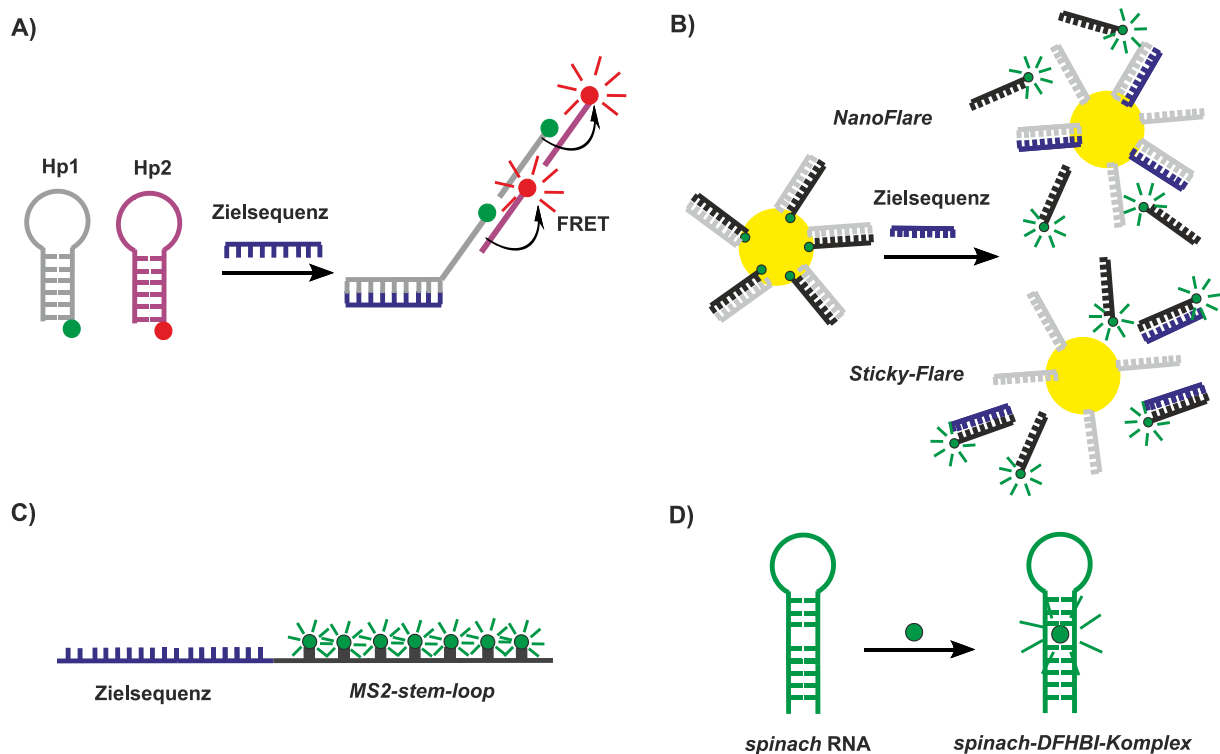
Hybridisierungssonden eine hohe Spezifität bei der Erkennung der Zielsequenz aufweisen und diese auch in ein gut erkennbares Fluoreszenzsignal mit hoher Quantenausbeute und gutem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis umwandeln.<sup>[63]</sup> Die Sonden sollten zudem eine hohe Nukleasestabilität aufweisen.<sup>[3]</sup> Ebenfalls muss die mRNA-Sequenz für die Hybridisierungssonden gut zugänglich sein. Das Problem liegt dabei oft in der komplexen Sekundärstruktur der langen mRNA-Sequenzen.



**Abbildung 2.6.1** Schematische Darstellung einer mRNA-Sekundärstruktur mit partieller Duplexstruktur, Ribonukleoproteinen (RNPs) und RNA-bindenden Komplexen.

Diese beinhalten bereichsweise Duplexstrukturen sowie gebundene Proteine (Abbildung 2.6.1). Weiterhin muss für die mRNA-Visualisierung die Einzigartigkeit der Sequenz gegeben sein, da ansonsten viele unspezifische Signale durch partielle Hybridisierung mit der Sonde entstehen. Aus diesem Grund wird zuvor eine BLAST-Analyse (*basic local alignment search tool*) der mRNA-Sequenz durchgeführt. Hierbei wird über das BLAST-Programm ein Vergleich der Sequenz mit den bereits experimentell ermittelten DNA-Sequenzen aus der Datenbank gezogen, um so eine ungewollte Überlappung der Sonden zu vermeiden. Die gängigsten Hybridisierungssonden für Lebendzelleexperimente wurden bereits in Kapitel 2.5 genauer erläutert. Darüber hinaus gibt es weitere Möglichkeiten der fluoreszenten Bildgebung, wie durch den Einsatz von HCR-Sonden (*hybridization chain reaction*), die optimale Hybridisierungssonden für die Visualisierung kleiner Mengen an Zielsequenz darstellen. Die durch eine Kettenreaktion ausgelöste verzweigte Hybridisierung mehrerer Sonden führt zu einer räumlichen Anhäufung dieser und somit zum Anstieg der punktuellen Fluoreszenzintensität (Abbildung 2.6.2 A).<sup>[64]</sup> Darüber hinaus gibt es die Partikel-basierten Methoden. Die 2007 von Mirkin *et al.* entwickelten *NanoFlares* sind ein beliebtes Werkzeug für die mRNA-Detektion in lebenden Zellen. Die Kombination von Reportersequenz und Nanopartikel führt dazu, dass der Transport der Sonden in die Zellen gewährleistet wird. Somit ist keine zusätzliche Transfektion mit den Hybridisierungssonden notwendig. Nach Durchdringen der Zellmembran kann die Zielsequenz das mit einem Farbstoff markierte Oligonukleotid von der Nanopartikeloberfläche verdrängen. Infolge der räumlichen Entfernung des mit Farbstoff markierten Oligonukleotids zum Nanopartikel folgt die Emission der Fluoreszenz (Abbildung 2.6.2 B).<sup>[63]</sup> Eine davon abgewandelte Variante stellen die *Sticky-Flares* dar. Diese sind ähnlich zu den *NanoFlares* aufgebaut, wobei das farbstoffmarkierte Oligonukleotid

direkt an die zu detektierende mRNA bindet (Abbildung 2.6.2 B).<sup>[65]</sup> Des Weiteren finden Goldnanopartikel, gebunden von Quantenpunkten (QD) und Oligonukleotiden, in der Lebendzell-Bildgebung Verwendung. Wird der QD durch die Ziel-mRNA vom Nanopartikel verdrängt, so kommt es durch die daraus resultierende räumliche Entfernung zu einem detektierbaren Photolumineszenzsignal.<sup>[66]</sup> Eine weitere verbreitete biochemische Methode ist das sogenannte *MS2-tagging*. Diese besteht aus einem mit Fluoreszenzproteinen (z.B. GFP, *green fluorescence protein*) gebundenem *MS2-stem-loop* (Abbildung 2.6.2 C).<sup>[67]</sup> Jener ist kovalent an die zu untersuchende RNA gebunden und wird vollständig von der Zelle exprimiert. Da die Zelle konstant fluoreszentes Protein bildet, stellt der Abbau des Proteins keine Limitierung bei den Experimenten dar. Dies ermöglicht die RNA-Detektion auch über längere Zeiträume. Ein Nachteil dieser Methode ist die Beschränkung auf die Detektion von transgener RNA. Somit muss stets sorgfältig überprüft werden, ob die Expressionslevel vergleichbar mit der *wildtyp*-RNA sind und das zusätzliche Molekulargewicht nicht die Lokalisation und Dynamik beeinflusst.<sup>[68]</sup> Die 2011 von Paige *et al.* entwickelte *spinach*-RNA ist ein Aptamer, welches spezifisch das organische Molekül DFHBI ((Z)-5-(3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzyliden)-2,3-Dimethyl-3,5-Dihydro-4H-Imidazol-4-on) unter Entstehung von Fluoreszenz bindet.<sup>[69]</sup> Das Aptamer kann somit ebenfalls als genetisch kodierbarer Fluoreszenzmarker für RNA-Moleküle eingesetzt werden.<sup>[70]</sup>



**Abbildung 2.6.2** Schematische Darstellung von A) *hybridization chain reaction* (HCR), B) *NanoFlares* und *Sticky-Flares*, C) *MS2-stem-loop* und D) *spinach*-RNA.

### 2.7 Transfektionsmethoden

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von DNA oder RNA in eine eukaryotische Zelle. Ein optimales Transfektionsergebnis zeigt sich von mehreren Faktoren abhängig, wie z.B. der Reinheit der zu transfizierenden Substanz, deren Größe und der Beschaffenheit der Zellmembran. Die Bedingungen müssen folglich für jede Zelllinie und jedes Experiment individuell angepasst und optimiert werden.<sup>[71]</sup> Für die Fluoreszenzmessungen in lebenden Zellen sollte der Transport der Sonden ohne hohe Toxizität ablaufen. Dafür existieren unterschiedliche Techniken, die sich in physikalische, biologische und chemische Verfahren unterteilen lassen.

Die gängigsten physikalischen Verfahren sind die Mikroinjektion,<sup>[9]</sup> Elektroporation<sup>[72]</sup> und das *CellSqueezing*®.<sup>[73]</sup> Die Mikroinjektion hat den Vorteil das Makromolekül in der bekannten Konzentration kontrolliert in eine Zelle zu überführen. Dabei ist die Größe des zu transportierenden Moleküls für die Effizienz nicht ausschlaggebend, was die hohe Beliebtheit für den Transport großer Moleküle erklärt.<sup>[2d]</sup> Mit Hilfe einer Glaskapillare wird das Makromolekül direkt in die einzelne Zelle eingeführt (Abbildung 2.7 A). Somit stellt dies die sicherste und effektivste Methode, mit einer Transfektionsrate von fast 100%, dar. Es können selbst mitotisch ruhende Zellen transfiziert und direkt vermessen werden, da keine langen Inkubationszeiten notwendig sind. Ein großer Nachteil ist jedoch der geringe Durchsatz (ca. 1 Zelle pro Minute).<sup>[2d]</sup> Zudem liegt eine geringe Flexibilität bezüglich der Zelltypen vor, da eine Mindestgröße der Zelle für die Mikroinjektion erforderlich ist.<sup>[74]</sup>

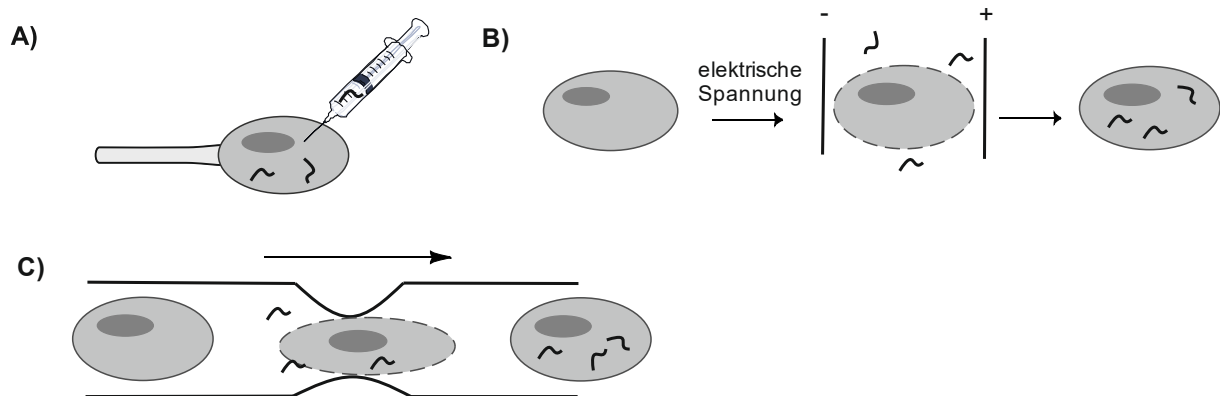
Bei der Elektroporation sind hingegen höhere Durchsätze, mit einer einfacheren Handhabung, erreichbar. Durch kurze Elektropulse wird die Membran temporär permeabilisiert (Abbildung 2.7 B). Die Porenmenge wird durch die Pulsstärke, die Porengröße hingegen durch die Pulsdauer kontrolliert.<sup>[2d]</sup> In dieser Zeit kann das Makromolekül, welches sich im Elektroporationspuffer befindet, in die Zelle gelangen. Jedoch zeigt sich, dass auch intrazelluläre Makromoleküle aus der Zelle hinaus diffundieren können, was zu einem erhöhten Zelltod nach der Elektroporation führt. Die Transfektionseffizienz ist dabei nicht bei allen Zellen homogen. Für adhärente Zellen kommt der zusätzliche Schritt der Trypsinierung hinzu, der bereits vor der eigentlichen Behandlung zu einem übermäßigen Stress für die Zellen führt und diese folglich schwächt.<sup>[10]</sup>

Ein ähnliches Prinzip verfolgt der *Cellqueezer*® (Abbildung 2.7 C), bei der die Zelle durch eine sehr kleine Öffnung gedrückt wird. Dadurch kommt es zur Permeabilisierung der Zellmembran,



## 2.7 Transfektionsmethoden

einhergehend mit der Aufnahme der Makromoleküle aus der Umgebung. Eine homogene Aufnahme ist auch hier nicht sichergestellt.



**Abbildung 2.7** Schematische Darstellung physikalischer Transfektionsmethoden. A) Mikroinjektion, B) Elektroporation und C) Cellsqueezing®.

Die chemischen Verfahren umfassen eine breite Reihe sehr unterschiedlicher zur Transfektion verwendeter Moleküle. Darunter fallen u.a. Lipide,<sup>[75]</sup> zellpenetrierende Peptide (*cell penetrating peptides*, CPPs),<sup>[11]</sup> kationische Moleküle,<sup>[76]</sup> porenbildende Enzyme,<sup>[41b]</sup> und kleine Moleküle, die z.B. bei der Calciumphosphatmethode eingesetzt werden.

Bei der Lipofektion wird das zu transportierende Makromolekül mittels kovalenter Bindung oder durch das Einschließen in eine Mizelle in die Zellen geschleust. Die Lipide interagieren über Endozytose mit der Biomembran, verschmelzen mit dieser und transportieren so die Makromoleküle in das Zellinnere. Folgend aus der starken Interaktion mit der Zellmembran kann diese Methode stark membranschädigend wirken.

Bei der Verwendung von zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) wird das Makromolekül, durch die Wechselwirkung der Peptide mit der Zellmembran, in das Zellinnere transportiert. Die aus der spezifischen Peptidsequenz resultierende Sekundär- bzw. Tertiärstruktur ermöglicht die Wechselwirkung mit der Biomembran. Bei den CPPs handelt es sich um kurze Peptide mit meist weniger als 30 Aminosäuren. Einen hohen Anteil bilden die positiv geladenen Aminosäuren Arginin und Lysin. Die erfolgreiche Verwendung eines negativ geladenen CPPs konnte ebenfalls gezeigt werden.<sup>[77]</sup> Sowohl die Art des Penetrationsmechanismus als auch die dafür entscheidenden Faktoren sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Wechselwirkung zwischen den Makromolekülen und Peptiden kann entweder durch Aggregation oder durch eine kovalente Bindung erfolgen. Da die CPPs oftmals an das zu transfizierende Molekül gekuppelt werden, resultiert diese Methode in einem erhöhten synthetischen Aufwand. Zudem sind lange Inkubationszeiten (über Nacht) und hohe Konzentrationen (> nM) für eine erfolgreiche

## 2.7 Transfektionsmethoden

---

Transfektion erforderlich. Ein weiterer Nachteil ist eine häufige Ansammlung der Makromoleküle in den Endosomen.<sup>[78]</sup>

Die Wechselwirkung mit kationischen Molekülen kann kovalent oder über Aggregation stattfinden. Bei der Aggregation wechselwirken die positiv geladenen Aminogruppen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und bilden sogenannte Polyplexe.<sup>[79]</sup> Die positiven Komplexe neigen dazu gut mit der Zellmembran zu interagieren, jedoch stellen auch hier die Aggregate in den Endosomen ein großes Problem dar. Aus diesem Grund können bei der Transfektion zusätzlich Stoffe, wie z.B. das Chloroquin oder das Polyethylenimin hinzugegeben werden.<sup>[80]</sup> Die Moleküle führen zu einer Erniedrigung des pH-Wertes in den Endosomen (pH 5 - 6.5), wobei der Ausgleich durch das Einpumpen von Protonen bzw. Wasser aus dem Zytosol zum Aufschluss der Endosomen führt.<sup>[81]</sup>

Unter der Kategorie der porenbildenden Enzyme ist das Streptolysin-O das Bekannteste. Es handelt sich dabei um ein Protein der Zellwände des Bakteriums *Streptococcus pyogenes*.<sup>[82]</sup> Die vom Enzym gebildeten Poren haben eine Größe von ca. 20 nm, was den Transport von 100 kDa Makromolekülen ermöglicht.<sup>[12]</sup> Das SLO kann je nach Zelltyp eine unterschiedlich hohe Toxizität aufweisen, da die Zusammensetzung der Membran für die Interaktion mit dem Enzym entscheidend ist. Das Binden des Enzyms an die Membran sowie die Bildung der Poren erfolgt nur temporär und kann durch zusätzliche Waschrunde mit PBS oder ähnlichen Puffern wieder rückgängig gemacht werden.

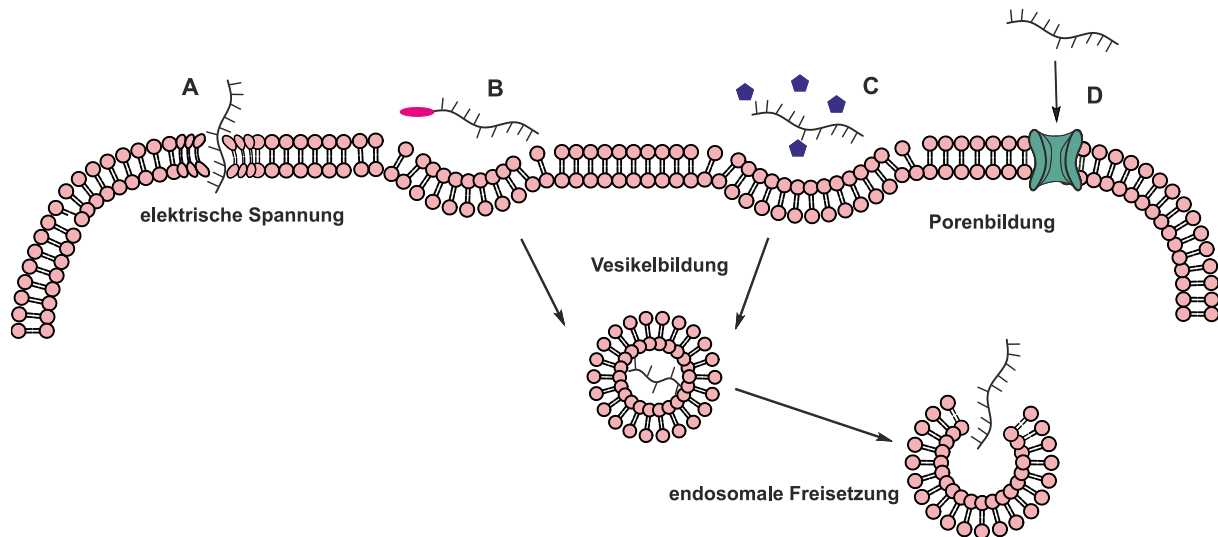
Die Transfektion mit Calciumphosphat ist nicht mit jedem Makromolekül kompatibel. Sie wird meist für den Transport von DNA, auf Grund des vorhandenen negativen Rückgrats, verwendet. Hier wird ein Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat hergestellt, wobei das ausfallende Calciumphosphat an die zu transportierende DNA aggregiert. Die ausgefallenen Kristalle werden der Zellkultur zugegeben und von den Zellen durch Endozytose aufgenommen.<sup>[83]</sup> Über den endosomalen Aufschluss gelangt die DNA in das Zytoplasma.

Bei den biologischen Verfahren ist die Transduktion mit Fremd-DNA die gängigste Methode. Viren sind kleinste Partikel die aus Erbmateriale (DNA oder RNA) und einer Proteinhülle bestehen. Sie benötigen für Ihre Fortpflanzung eine geeignete Wirtszelle. Der Replikationszyklus eines Virus beginnt mit der Adsorption an die Zielzelle. Dies geschieht mit sehr hoher Effizienz nahe 100% ohne einen starken Einfluss auf die Zellviabilität zu haben. Anschließend wird das Erbmateriale der Viren in die Zelle geschleust. Die Methode kann auch für die stabile Transfektion verwendet werden.<sup>[84]</sup> Es muss jedoch auch ein höherer Sicherheitsstandard in den Laboren vorliegen, der nicht immer gewährleistet sein kann.

## 3. Zielstellung

In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe Seitz konnte das Prinzip der TO-PNA-FIT-Sonden erfolgreich auf DNA-basierte Systeme übertragen und optimiert werden.<sup>[19a]</sup> Mitunter ermöglichte der Einbau von 2'-O-Me-RNA-Bausteinen und einem LNA-Monomer in direkter Nachbarschaft zum Cyaninfarbstoff helle, responsive und nukleaseresistente Mixmer-Sonden für die RNA-Detektion in lebenden Zellen.<sup>[3, 8a]</sup> Streptolysin-O diente bereits für den Transport von PNA-FIT-Sonden in MDCK-Zellen.<sup>[8b]</sup> DNA-FIT-Sonden wurden hingegen durch Mikroinjektion in lebende Oozyten der *Drosophila Melanogaster* eingebracht.<sup>[3]</sup> Da die Mikroinjektion jedoch nur bei bestimmten Zellen, wie z.B. den Oozyten, mit einer sehr geringen Durchsatzrate anwendbar ist, muss die Transfektion der FIT-Sonden für die gängigen Zelllinien weiterhin untersucht und verbessert werden.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung und Optimierung der Transfektion von DNA- und PNA-FIT-Sonden in lebende Zellen. Sowohl der Einfluss der Transfektionsmoleküle auf das Fluoreszenzverhalten der Sonden als auch das Verhalten der FIT-Sonden nach Durchdringen der Zellmembran, sollen Bestandteil der Untersuchung werden. Der Einfluss des negativ geladenen DNA-Rückgrats im Vergleich zur hydrophoben ungeladenen PNA, kann einen essenziellen Unterschied im Verhalten der Sonden bewirken und soll dementsprechend genauer analysiert werden. Die häufig genutzten zellpenetrierenden Peptide (CPPs) sollen über eine kovalente Bindung mit den Sonden verknüpft werden.<sup>[85]</sup> Zudem soll die Transfektion durch Aggregation mit Polyplexen,<sup>[86]</sup> durch kommerziell erhältliche Reagenzien, wie z.B. die Palmitinsäure sowie das porenbildende Enzym Streptolysin-O<sup>[87]</sup> und durch die Elektroporation<sup>[88]</sup> untersucht werden (Abbildung 3.1). Der systematische Vergleich der Zellaufnahme von DNA- und PNA-FIT-Sonden wird hierfür an genetisch veränderten *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen erfolgen. Diese wurden in vorherigen Arbeiten von Friedrich *et al.* für die Anwendung mit FIT-Sonden hergestellt. Die Zellen verfügen über eine sich 45-fach wiederholende mRNA-Sequenz. Die Wiederholungssequenz soll dabei als Ziel-mRNA für die FIT-Sonden dienen. Durch die Zugabe von Doxycyclin lässt sich die Transkription der mRNA initiieren. Der qualitative Vergleich der Transfektionseffizienz soll im Anschluss an die Transfektionsexperimente mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops und der Fluoreszenzemission der FIT-Sonden erfolgen.



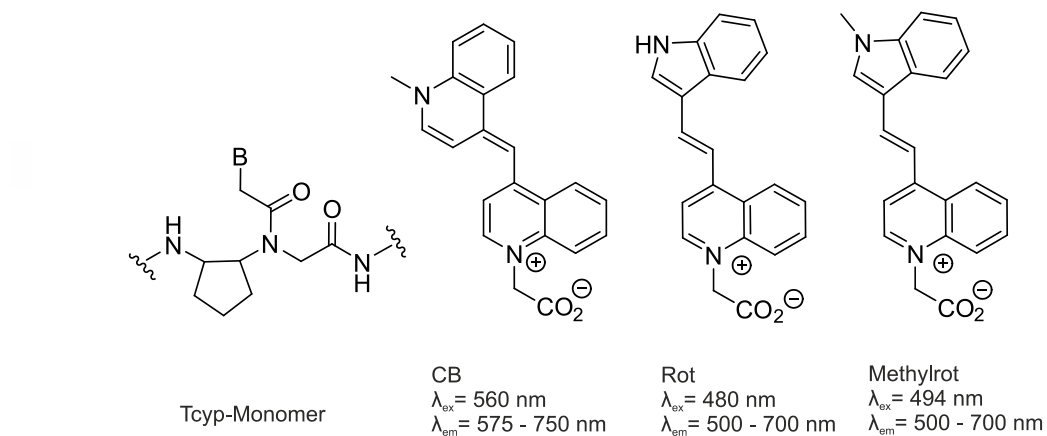
**Abbildung 3.1** Schematische Darstellung der zu testenden Transfektionsmethoden. A) Elektroporation, B) kovalente Anbindung eines Transfektionsmoleküls, C) Transfektion über Aggregation mit einem Transfektionsreagenz und D) Porenbildung mit Streptolysin-O.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Unterscheidung bzw. spezifische Markierung von T-Zellen durch TO-FIT-Sonden. Die Sequenz der Sonden soll dabei komplementär zur TCR-mRNA drei verschiedener T-Zelllinien sein (Jurkat, CCRF-CEM und Molt-16). Die CDR3-Region der TCR-mRNA bietet eine optimale Zielsequenz, da sich diese innerhalb der T-Zelllinien bereichsweise unterscheidet und die Antigenspezifität der T-Zelle bestimmt. Es sollen die Bedingungen für die Zellexperimente untersucht und optimiert werden. Ein verbessertes FIT-Sonden-Design mit einem zweiten Farbstoff soll die Auswertung erleichtern. Der zweite Farbstoff soll die Responsivität der TO-Emission erhöhen und als Korrekturfaktor für die TO-Emission dienen.<sup>[89]</sup> Ziel soll es sein, anhand der TO-Fluoreszenzintensität einer FIT-Sonde eine bestimmte T-Zelllinie innerhalb einer Mischpopulation zu erkennen.

Darüber hinaus soll an der Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften der FIT-Sonden gearbeitet werden. Der von Hövelmann *et al.* entwickelte Farbstoff Chinolinblau (CB)<sup>[53a]</sup> soll dementsprechend für verschiedene zelluläre Anwendungen, wie z.B. die Visualisierung des Verlaufs einer Influenza A-Infektion, hergestellt und untersucht werden. Der Farbstoff zeigte bereits in den Messungen von Hövelmann *et al.* ein Emissionsmaximum bei 605 nm, einen bis zu 195-fachen Fluoreszenzanstieg und Quantenausbeuten von bis zu 0.47.<sup>[8a]</sup> In Folge seiner Emission im roten Wellenlängenbereich scheint der Farbstoff ideal für zelluläre Anwendungen. Zusätzlich soll die Synthese und Evaluation neuer Farbstoffe mit einem Absorptionsmaximum bei 590/596 nm stattfinden. Hierfür sollen die von Bohländer *et al.* entwickelten Chromophore für den Einbau in FIT-Sonden dienen.<sup>[90]</sup>

### 3. Zielstellung

Ferner soll ein von Appella *et al.* untersuchtes zyklisches Tcyp-Monomer zur Verstärkung der Duplexstabilität und damit einhergehender Steigerung der Helligkeit sowie Responsivität in TO-PNA-FIT-Sonden analysiert werden.<sup>[91]</sup> Die zu untersuchenden Moleküle sind in Abbildung 3.2 dargestellt.



**Abbildung 3.2** Strukturformeln des Tcyp-Monomers, des Chinolinblaus (CB) und der zu synthetisierenden Farbstoffe Rot und Methylrot.  $\lambda_{\text{ex}}$  = Anregungswellenlänge und  $\lambda_{\text{em}}$  = Emissionswellenlänge.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

Um dynamische Stoffwechselprozesse oder biologische Veränderungen innerhalb einer Zelle zu messen sind Experimente an lebenden Zellen essentiell.<sup>[60-61, 92]</sup> Die notwendigen Eigenschaften der Sonden, wie die Nukleaseresistenz oder die hohe Responsivität und Helligkeit, wurden zuvor durch Arbeiten von Seitz *et al.* optimiert.<sup>[3, 8a]</sup> Es gelang bereits das Einbringen von TO-PNA-FIT-Sonden in MDCK-Zellen durch Streptolysin-*O*<sup>[8b]</sup> und die Mikroinjektion von DNA-FIT-Sonden in Oozyten der *Drosophila Melanogaster*.<sup>[3]</sup> Jedoch erweist sich die Mikroinjektion bei den üblich verwendeten Zelllinien, auf Basis derer geringen Größe, als problematisch. Weiterhin ist die geringe Durchsatzrate von 1 Zelle pro Minute für viele biologische Anwendungen unzureichend.<sup>[2d]</sup> Anhand eines Testsystems sollte das Verhalten der DNA- und PNA-FIT-Sonden bezüglich der Zellaufnahme und deren Fluoreszenzeigenschaften innerhalb der Zellen betrachtet werden.<sup>[71]</sup>

#### 4.1.1 Synthese von FIT-Sonden-Peptid-Konjugaten/Aggregaten

Um die zellpenetrierenden Peptide (CPPs) für den Transport von FIT-Sonden in lebende Zellen zu untersuchen, sollte zunächst die Bindungsart zwischen den FIT-Sonden und den Peptiden evaluiert werden.<sup>[93]</sup> Die Thiol-Maleimid-Chemie (Abbildung 4.1.1 A II und B II) ist durch ihren breiten Anwendungsbereich in der biomolekularen Modifikation sowie in der Polymerkonjugation für die Verbindung von DNA und Peptid gut geeignet.<sup>[94]</sup> Eine Disulfid-Verknüpfung (Abbildung 4.1.1 C) zwischen PNA und Peptid hat darüber hinaus den Vorteil innerhalb der Zellen spaltbar zu sein. Demzufolge sollten die FIT-Sonden nach der Transfektion innerhalb der Zellen freigesetzt werden. Es wurden im Folgenden beide Bindungsarten untersucht.

Vor der Peptid-Festphasensynthese fand zunächst die manuelle Beladung des Polystyrol-Harzes mit MMT-Lysin am C-Terminus statt. Das MMT-Lysin wurde final durch die Reaktion mit einer 6-Maleimidhexansäure funktionalisiert. Ein zusätzliches terminales Cystein an der AS-Sequenz einiger Peptide ermöglichte die spätere Ausbildung eines Disulfids. Die Kupplung der darauffolgenden Aminosäuren wurde nach der Fmoc-Strategie mithilfe der automatisierten Peptid-Festphasensynthese durchgeführt.

#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

Die Funktionalisierung der Oligonukleotide erfolgte während der DNA-Festphasensynthese durch Kupplung eines kommerziell erhältlichen Trityl-Thiol-Linkers an der 5'-Position der Sequenz (Abbildung 4.1.1 A I). Da jedoch das zur Entschützung der Trityl-Gruppe nötige DTT (Dithiothreitol) nach der Reaktion nicht vollständig eliminiert werden konnte und die nachfolgende Kupplung störte, wurde die Trityl-Schutzgruppe durch eine Disulfid-Schutzgruppe ausgetauscht. Diese konnte mithilfe von 5 mM TCEP über Nacht reduziert werden (Abbildung 4.1.1 B I).

Während der Kupplungsreaktion von Thiol und Maleimid bildete die negativ geladene DNA mit den positiv geladenen Peptiden Aggregate aus, die in der Kupplungslösung ausfielen. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Reaktion Harnstoffpuffer hinzugegeben. Dieser führte zum Auflösen der Aggregate (Abbildung 4.1.1 B II) und ermöglichte die anschließende Aufreinigung durch die HPLC (Abbildung 4.1.1 D).

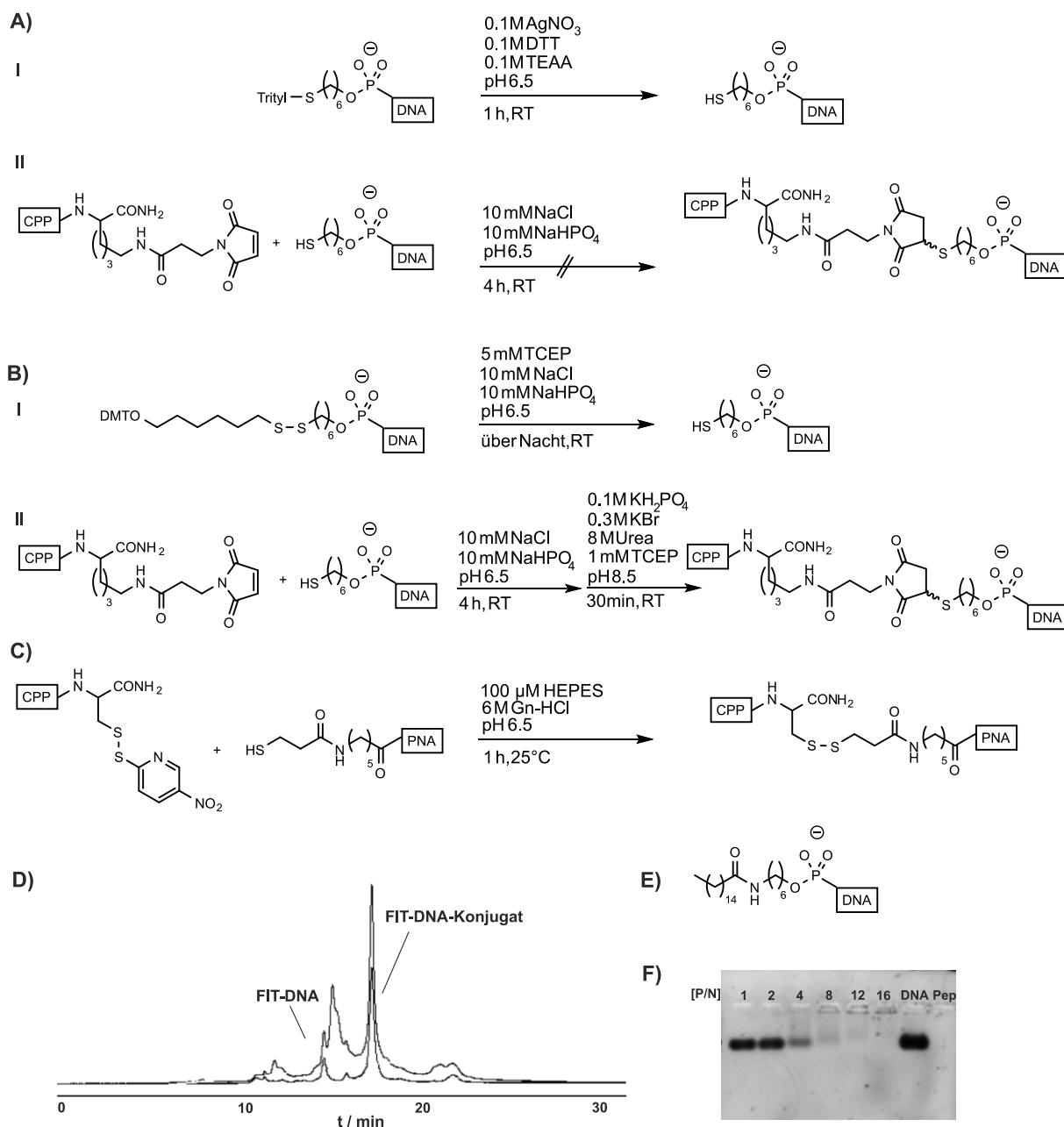
Die Funktionalisierung am N-Terminus der PNA-Sonden wurde durch die manuelle Kupplung von Fmoc-6-Ahx-OH und 3-(Tritylthio)-propionsäure durchgeführt. In Folge der Säurelabilität der Trityl-Schutzgruppe wurde diese bereits während des Abspaltungsprozesses mit TFA und der präparativen HPLC-Aufreinigung abgetrennt. Somit war kein weiterer Reaktionsschritt zur Entschützung notwendig. Die Zugabe von Harnstoffpuffer war bei der Synthese der PNA-Peptid-Konjugate nicht erforderlich, da das neutrale Rückgrat der PNA die Entstehung von Aggregaten verhinderte. Ein DTNP-(2,2'-Dithiobis(5-nitropyridine)) am Cystein der Peptide ermöglichte eine selektive Disulfid-Ausbildung mit dem Thiol der FIT-PNA ohne den Erhalt von Nebenprodukten, wie PNA-Peptid-, PNA-PNA- und Peptid-Peptid-Konjugaten (Abbildung 4.1.1 C).

Die Anbindung der kommerziell erhältlichen Palmitinsäure an die FIT-DNA erfolgte am 5'-Ende während der DNA-Festphasensynthese (Abbildung 4.1.1 E). Eine Kupplung über das 3'-Ende wäre ebenfalls möglich gewesen, hätte jedoch die anschließende Aufreinigung mithilfe der präparativen HPLC erschwert. Grund hierfür ist das hydrophobe Verhalten des Lipids, welches die Retentionszeit in der HPLC stark beeinflusst und das Trennen von Abbruchsequenzen nur durch einen hohen Anteil an Acetonitril (> 70%) ermöglicht.

Um die Transfektion der FIT-Sonden durch die Aggregation mit CPPs oder Polyplexen zu evaluieren, war es wichtig im Vorfeld das richtige Verhältnis von positiver zu negativer Ladung zu ermitteln. Da bekannt ist, dass positiv geladene Moleküle bevorzugt die Biomembran der Zellen durchdringen, war es sinnvoll das negativ geladene Rückgrat der DNA vollständig mit dem positiv geladenen Peptid abzuschirmen.<sup>[86]</sup> Für das richtige Verhältnis von Peptid zu DNA wurde ein 1%-Agarosegel hergestellt und unterschiedlichste Mengen von DNA-FIT-Sonde und Oktaarginin aufgetragen (Abbildung 4.1.1 F). Als Referenz diente sowohl die reine FIT-Sonde als auch das reine

## 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

Oktaarginin. Das Verhältnis von positiver Ladung [P] zu negativer Ladung [N] erwies sich in diesem Zusammenhang als ausschlaggebend für einen effektiven Sondentransport.<sup>[86]</sup> Die DNA wurde nach der Gelelektrophorese mit *SYBRGold*<sup>TM</sup> angefärbt. Das Verhältnis [P/N] von 16 bzw. höher resultierte in einer komplett umhüllten DNA, welche nicht mehr durch *SYBRGold*<sup>TM</sup> angefärbt werden konnte.



**Abbildung 4.1.1** Reaktionsgleichungen der Kupplungen von FIT-Sonden mit zellpenetrierenden Peptiden. A) Schutzgruppenabspaltung mit  $\text{AgNO}_3$  und DTT. B) Schutzgruppenabspaltung mit TCEP und anschließender Kupplung unter Einsatz von Harnstoff (Urea). C) Selektive Verknüpfung von PNA und Peptid über eine Disulfid-Verbindung. D) HPLC-Analyse des Rohprodukts nach Kupplung der FIT-DNA (**DNA-24**) mit TAT. E) Anbindung der Palmitinsäure am 5'-Terminus der DNA. F) 1%-Agarosegel mit verschiedenen Verhältnissen von positiver Ladung [P] und negativer Ladung [N] und der reinen 24 Nukleotid langen FIT-Sonde (**DNA-24**) sowie des reinen Oktaarginins. Die DNA wurde mit *SYBRgold*<sup>TM</sup> angefärbt. **DNA-24**: TTA (TO)TT AAG TCG TTA GTC CGA TTG, Oktaarginin: RRRRRRRR.

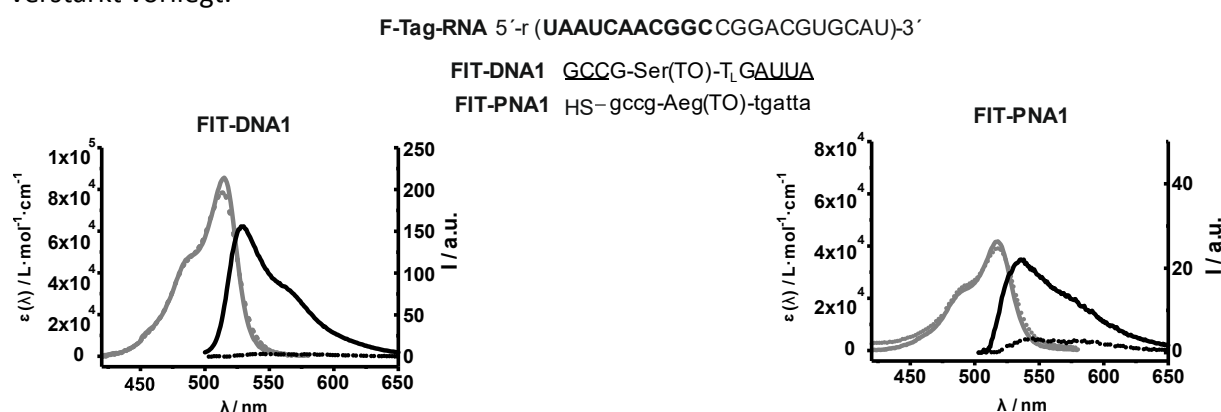


## 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

Es wurden somit zwei kovalente Bindungsarten, die Thiol-Maleimid- sowie die Disulfid-Verknüpfung, für die Kupplung von FIT-Sonden und CPPs etabliert.  $[P/N] = 16$  stellte dabei das optimale Verhältnis von positiver zu negativer Ladung für die Bildung von Aggregaten dar.

### 4.1.2 Fluoreszenzeigenschaften von DNA-FIT-Sonden-Aggregaten

Für den Vergleich der Eigenschaften von DNA- und PNA-FIT-Sonden wurden zunächst zwei identische TO-markierte FIT-Sonden hergestellt (Abbildung 4.1.2.1). Die Sonden waren jeweils komplementär zum 5'-Ende der F-Tag-RNA (5' **UAA UCA ACG GCC** GGA CGU GCA U 3') aufgebaut. Ein Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften zeigte eine höhere Responsivität sowie Helligkeit für die **FIT-DNA1**. Die erniedrigte Absorption der **FIT-PNA1** könnte auf die hydrophobe Wechselwirkung des Fluorophors mit der PNA zurückzuführen sein, die in wässrigen Puffern verstärkt vorliegt.

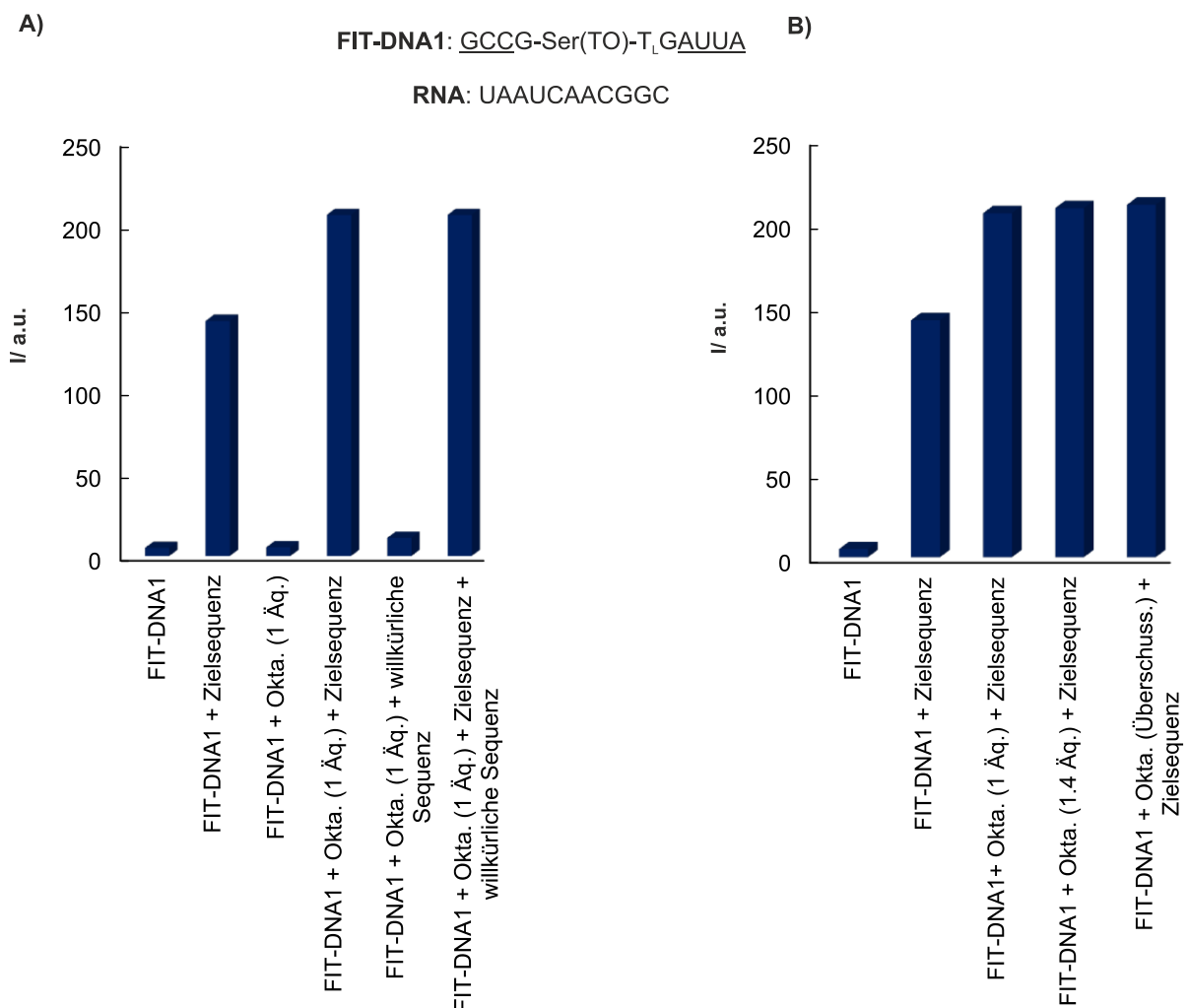


**Abbildung 4.1.2.1** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der **FIT-DNA1** und **FIT-PNA1** im Einzel- (gestrichelt) und im Doppelstrang (durchgezogen) vor und nach Zugabe von 5 Äq. RNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7) bei 37 °C.  $\lambda_{\text{ex}} = 485$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 500 - 650$  nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

Es folgte eine genauere Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften der DNA-FIT-Sonden-Aggregate am Fluoreszenzspektrometer. In Abbildung 4.1.2.2 A sind die Fluoreszenzwerte der **FIT-DNA1**, Oktaarginin und der komplementären Zielsequenz in unterschiedlichen Kombinationen dargestellt. Zunächst wurde die Sonde im Einzelstrang in einer 0.5  $\mu$ M Konzentration vermessen. Es resultierte eine Fluoreszenzintensität von  $I_0 = 4.9$ , welche nach Hybridisierung mit 5 Äq. der Zielsequenz auf  $I = 142$  anstieg. Die Zugabe von 1 Äq. Oktaarginin zum Einzelstrang der FIT-Sonden änderte die Fluoreszenzemission unmerklich. Es konnte jedoch eine erhöhte TO-Emission nach zusätzlicher Zugabe der Zielsequenz beobachtet werden. Diese zeigte sich im Gegensatz zur Emission des reinen Duplex um ca. 30% erhöht. Eine nicht-komplementäre Sequenz wies diesen Effekt nicht auf. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass Oktaarginin weder die Selektivität noch die

#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

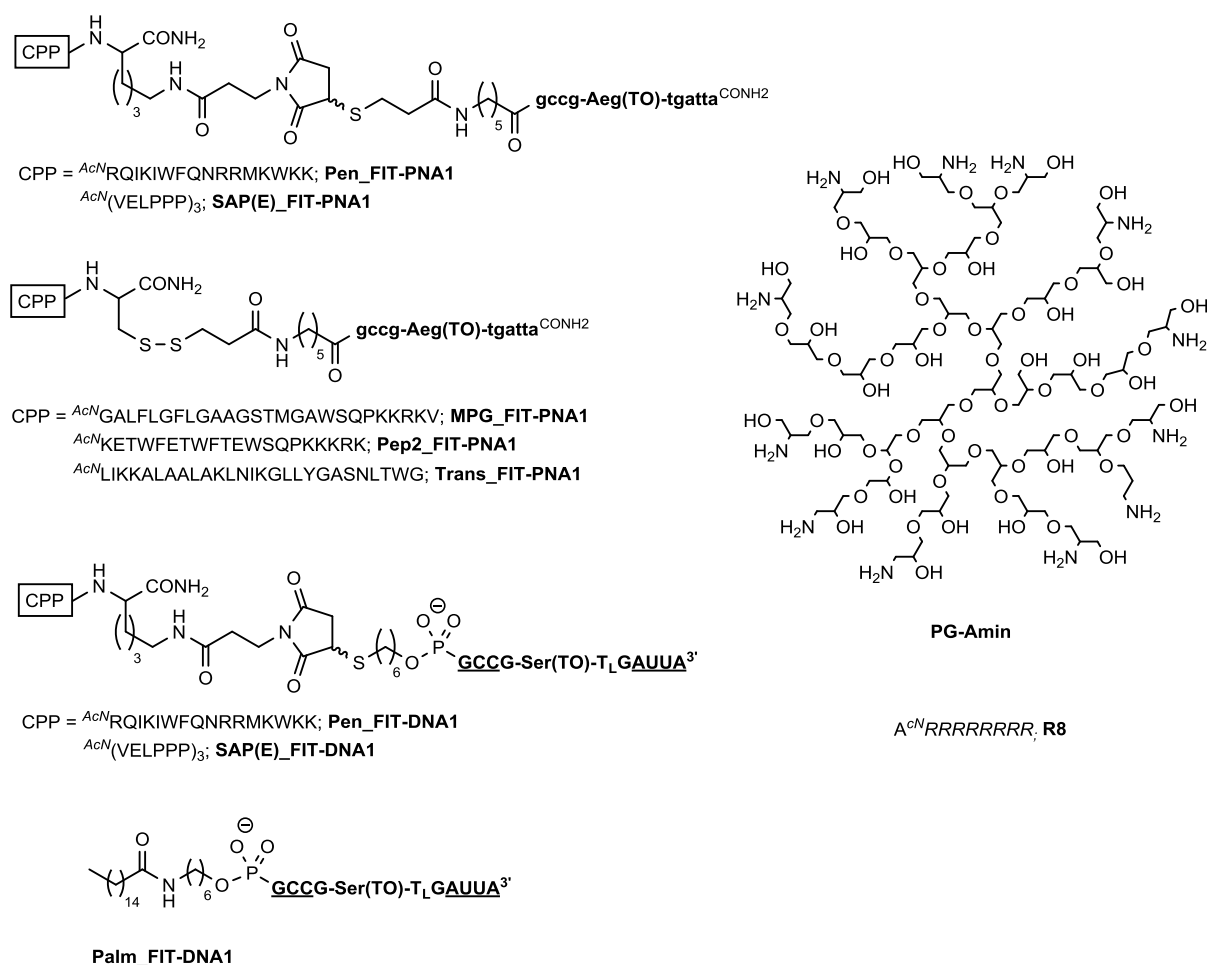
Spezifität der Sonden negativ beeinflusste, sondern stattdessen zur Erhöhung der Stabilität der Duplexstruktur beitrug. In Kapitel 4.1.1 wurde bereits gezeigt, dass ein erhöhter Anteil des Peptids die vollständige Komplexierung der Sonde begünstigt. Das Balkendiagramm in Abbildung 4.1.2.2 B zeigt die Fluoreszenzwerte der FIT-Sonden nach der Zugabe unterschiedlicher Mengen an Peptid. Wie im vorangegangenen Versuch lag die Erhöhung der Fluoreszenzintensität, durch Zugabe von 1 Äq. Oktaarginin zum Duplex, bei ca. 30%. Nach der Zugabe von 1.4 Äq. Peptid, sprich bei der gleichen Ladungsmenge, stieg die Intensität nochmals um 3% an. Ein Überschuss (36 Äq.) an Peptid konnte folglich eine um über 33% erhöhte Fluoreszenzintensität, im Vergleich zur reinen hybridisierten FIT-Sonde, mit der Zielsequenz erzielen. Jener Umstand könnte in den Zellen zu einer erhöhten Intensität der Fluoreszenzemission führen, die das Mikroskopieren von geringen Mengen an Zielsequenz erleichtern könnte. Die Voraussetzung war jedoch, dass die FIT-Sonden vergleichbar selektiv wie in den *in vitro* Experimenten blieben.



**Abbildung 4.1.2.2** A) Vergleich der Fluoreszenzemission von **FIT-DNA1** mit Oktaarginin, RNA-Zielsequenz und nicht-komplementärer RNA-Sequenz. B) Vergleich der Fluoreszenzemission nach Hybridisierung von **FIT-DNA1** mit RNA-Zielsequenz und unterschiedlichen Mengen an Oktaarginin. Überschuss: 36 Äq., Oktaarginin: RRRRRRRR. Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde mit 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37 °C.  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 535 nm.

### 4.1.3 Fluoreszenzeigenschaften von FIT-Sonden-Konjugaten/Aggregaten

Im Anschluss wurden die FIT-Sonden-Konjugate nach der in Kapitel 4.1.1 etablierten Kupplungschemie synthetisiert und am Fluoreszenzspektrometer untersucht. Da die Ladung der Makromoleküle bekanntermaßen einen Einfluss auf die Wechselwirkung mit der Biomembran hat, wurden für den direkten Vergleich von DNA- und PNA-Sonden zwei unterschiedlich geladene, hydrophile Peptide ausgewählt. Zum einen diente das aus der ersten Generation bekannte, positiv geladene Peptid Penetratin<sup>[95]</sup> und zum anderen ein erst kürzlich entdecktes, negativ geladenes Peptid, das SAP(E) (Abbildung 4.1.3).<sup>[77]</sup> Für die Kupplung diente die Thiol-Maleimid-Chemie. Die Peptide Transportan,<sup>[96]</sup> Pep2<sup>[97]</sup> und MPG<sup>[98]</sup> wurden über eine spaltbare Disulfid-Verbindung an die PNA-Sonden angebracht. Für die Aggregation dienten das Oktaarginin und das Polyglycerol-Amin aus der Arbeitsgruppe Haag<sup>[99]</sup> (FU Berlin). Alle verwendeten Moleküle sind in Abbildung 4.1.3 zu sehen.<sup>[98a, 100]</sup>



**Abbildung 4.1.3** Anbindungschemie der **FIT-PNA1** und **FIT-DNA1** an die zellpenetrierenden Peptide und das Lipid sowie der Aufbau der zur Aggregation verwendeten Moleküle. Pen = Penetratin, Trans = Transportan, Palm = Palmitinsäure, PG-Amin = Polyglycerol-Amin, R8 = Oktaarginin.

#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

Das Polyglycerol-Amin kann durch seine terminalen Amin-Funktionen mit dem DNA-Rückgrat der Sonden aggregieren. Die Bildung der Aggregate erfolgte direkt vor der Inkubation der Zellen, durch Schütteln beider Moleküle in einem Verhältnis von  $[P/N] = 16$  in PBS. Die Modifizierung der **FIT-DNA1** mit einer kommerziell erhältlichen Palmitinsäure wurde während der DNA-Festphasensynthese durchgeführt. Im Folgenden wurden die Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren der FIT-Sonden, FIT-Sonden-Konjugate und FIT-Sonden-Aggregate vor und nach der Hybridisierung mit synthetischer RNA-Zielsequenz vermessen. Die Fluoreszenzintensität im Einzel- sowie Doppelstrang, die Fluoreszenzsteigerung, der Extinktionskoeffizient und die Schmelztemperatur sind in Tabelle 4.1.3 aufgelistet.

**Tabelle 4.1.3** TO-markierte FIT-Sonden und deren Konjugate.

| Sonde                   | $I_0$ | $I$ | $I/I_0$ | $\epsilon_{\max}$ | $T_m$ |
|-------------------------|-------|-----|---------|-------------------|-------|
| <b>FIT-DNA1</b>         | 4.9   | 142 | 29      | 85640             | 49    |
| <b>Pen_FIT-DNA1</b>     | 4.7   | 140 | 30      | 75780             | 49    |
| <b>SAP(E)_FIT-DNA1</b>  | 3.8   | 110 | 29      | 64780             | 44    |
| <b>R8+FIT-DNA1</b>      | 5.7   | 161 | 28      | 85640             | 60    |
| <b>PG-Amin+FIT-DNA1</b> | 5.6   | 162 | 29      | 85625             | 60    |
| <b>Palm_FIT-DNA1</b>    | 9.7   | 115 | 12      | 57170             | 49    |
| <b>FIT-PNA1</b>         | 2.7   | 22  | 8       | 41790             | 52    |
| <b>Pen_FIT-PNA1</b>     | 15    | 68  | 4.5     | 64310             | 58    |
| <b>SAP(E)_FIT-PNA1</b>  | 9.9   | 45  | 4.5     | 45460             | 56    |
| <b>Pep2_FIT-PNA1</b>    | 11    | 68  | 6       | 62320             | 53    |
| <b>Transp_FIT-PNA1</b>  | 3.2   | 11  | 3.5     | 43460             | 49    |
| <b>MPG_FIT-PNA1</b>     | 2.5   | 12  | 5       | 40620             | 52    |

$I_0$  = Fluoreszenzintensität im Einzelstrang,  $I$  = Fluoreszenzintensität nach Hybridisierung mit 5 Äq. RNA-Zielsequenz,  $\epsilon_{\max}$  = Extinktionskoeffizient bei höchster Absorption im Doppelstrang,  $T_m$  = Schmelztemperatur vom Doppelstrang mit 1 Äq. RNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5. Äq. RNA-Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37 °C.  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 650 nm,  $\text{slit}_{\text{ex}}$  = 5 nm,  $\text{slit}_{\text{em}}$  = 5 nm. Bedingung Schmelztemperatur: 20 - 90 °C,  $\lambda_{\text{em}}$  = 260 nm.

Die **FIT-DNA1** besaß durch ihren Fluoreszenzanstieg von  $I/I_0 = 29$  gute Voraussetzungen für den Einsatz in Lebendzelleexperimenten. Die Schmelztemperatur von 49 °C war gering genug, um eine ungewollte Basenfehlpaarung zu verhindern, jedoch ausreichend hoch, um eine Lebendzell-Bildgebung sicherzustellen. Im Vergleich dazu lag der Fluoreszenzanstieg der **FIT-PNA1** lediglich bei  $I/I_0 = 8$ , mit einer Schmelztemperatur von 52 °C.

Die Konjugation der **FIT-DNA1** mit Penetratin führte zu keinen großen Veränderungen der Fluoreszenzeigenschaften. Ebenfalls erfolgte die Hybridisierung von Sonde und Zielsequenz weiterhin problemlos. Im Gegensatz dazu erhöhte die Konjugation des Penetratins an die

---

**FIT-PNA1** die Fluoreszenzemission im Einzel- und im Doppelstrang. Eine höhere Intensitätssteigerung im Einzelstrang sowie Erniedrigung der Responsivität waren zu erkennen. Die erhöhte Schmelztemperatur um 6 °C deutete auf eine verstärkte Duplexstabilität, bedingt durch die Wechselwirkungen der Sonde mit dem Peptid hin. Eine ähnliche Tendenz war beim **SAP(E)\_FIT-PNA1**-Konjugat zu erkennen. Bei der **SAP(E)\_FIT-DNA1** war eine Erniedrigung der TO-Emission vor und nach der Hybridisierung mit der Zielsequenz sowie Erniedrigung der Schmelztemperatur ( $T_M = 44$  °C) zu beobachten. Die Responsivität blieb dabei unverändert. Im Gegensatz dazu lag die Responsivität der **Palm\_FIT-DNA1** stark verringert vor. Ebenfalls konnte eine Rotverschiebung in der Einzelstrangfluoreszenz bemerkt werden (Anhang, Abbildung 9.1.2.1). Die breite Emissionsbande im Einzelstrang war auf die Interaktion zweier Farbstoffe zurückzuführen. Die Fluoreszenzspektren, die nach der Zugabe von Oktaarginin zur **FIT-DNA1** gemessen wurden, zeigten sowohl für die einzelsträngige als auch doppelsträngige Form eine erhöhte Intensität der TO-Emission sowie erhöhte Schmelztemperatur ( $T_M = 60$  °C). Selbiges wurde bei der Aggregation mit dem PG-Amin beobachtet. Wie bereits zuvor erwähnt, konnte dies auf die Stabilisierung der Duplexstruktur zurückgeführt werden.

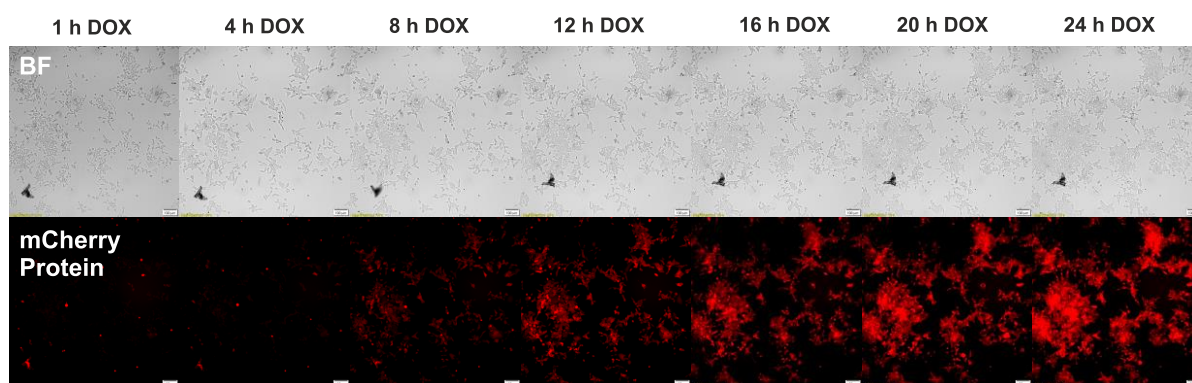
Die zusätzlich mit der PNA gekuppelten CPPs, wie das Transportan und das MPG, sorgten für eine Abnahme der TO-Emission im Doppelstrang. Das Pep2 bewirkte hingegen im Einzel- sowie Doppelstrang eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität, jedoch Abnahme der Responsivität.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei allen Verbindungen von CPP und **FIT-PNA1** eine Abnahme der Responsivität, unabhängig von der Fluoreszenzintensität, zu beobachten war. Es schien eine verstärkte Wechselwirkung zwischen PNA und Peptid, möglicherweise bedingt durch die hydrophoben Eigenschaften, vorzuliegen. Der Einfluss der Peptide auf die Fluoreszenzeigenschaften der **FIT-DNA1** fielen hingegen, mit Ausnahme der **Palm\_FIT DNA1**, vernachlässigbar gering aus.

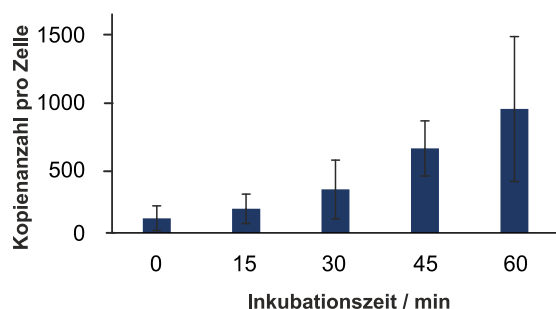
### 4.1.4 Zellsystem für den systematischen Vergleich der FIT-Sonden-Aufnahme

Der systematische Vergleich der Zellaufnahme von DNA- und PNA-FIT-Sonden sollte anschließend anhand der von Friedrich *et al.* genetisch veränderten *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zelllinie erfolgen. Die Zelllinie enthält ein Plasmid mit 45 Wiederholungseinheit einer 22 Nukleotid langen F-Tag-RNA (5' TAA TCA ACG GCC GGA CGT GCA T 3'). Die Sequenzen der hergestellten Sonden und deren Konjugate waren komplementär zu dieser aufgebaut. Die mRNA liegt dabei in direkter Nachbarschaft zur 3'-UTR-mRNA des fluoreszierenden *mCherry*-Proteins. Durch die Zugabe von 2 µg/ml Doxycyclin wird die sofortige Transkription der Vektor-mRNA eingeleitet. In Abbildung 4.1.4 A ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzemission des *mCherry*-Proteins über 24 h abgebildet.

A)



B)



C)



**Abbildung 4.1.4** A) Zeitlicher Verlauf der *mCherry*-Protein-Bildung von *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen nach Zugabe von Doxycyclin (2 µg/ml). Gezeigt sind die Bilder der Hellfeldmikroskopie (BF) und der Fluoreszenzmikroskopie, aufgenommen an einem 10 x Objektiv. Filter: CB:  $\lambda_{\text{ex}} = 575/25 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 628/40 \text{ nm}$ . B) PCR-Analyse (Mittelwert mit Standardabweichung) der Anzahl an mRNA-Kopien pro Zelle nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die Stimulation wurde mit 2 µg/ml Doxycyclin durchgeführt. C) Schematische Darstellung des *mCherry*-Proteins <sup>[102]</sup>.

Durch die notwendige Translation sowie Faltung des Proteins ist die Fluoreszenz erst nach ca. 8 h am Fluoreszenzmikroskop sichtbar. <sup>[101]</sup> Die Transkription der mRNA sollte hingegen direkt nach der Zugabe von Doxycyclin beginnen und demzufolge für die FIT-Sonden detektierbar sein. Zur genauen Quantifizierung der mRNA innerhalb einer Zelle diene die Echtzeit-PCR. Die dafür nötige RNA wurde von jeweils  $2 \cdot 10^5$  Zellen, nach der Inkubation mit 2 µg/ml Doxycyclin in phenolrotfreiem DMEM über verschiedene Zeitintervalle (0 min, 15 min, 30 min, 45 min und

#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

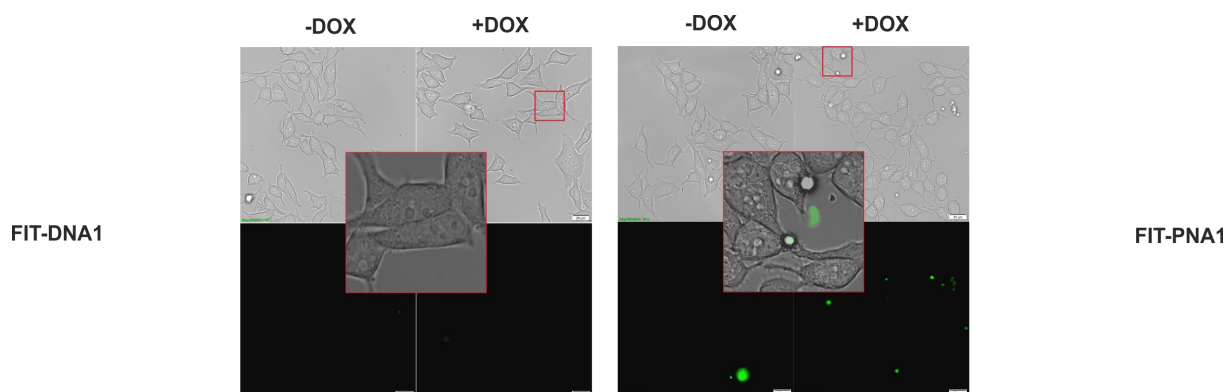
60 min), mit einem *RNeasy Mini Kit (50)* isoliert. Die Messungen wurden mit biologischen Triplikaten durchgeführt, sodass der Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung bestimmt werden konnte (Abbildung 4.1.4 B). Nach der Isolation folgte die Transkription in cDNA. Die PCR-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Knoll durchgeführt. Für die Echtzeit-PCR dienten *mCherry*-ORF spezifische Primer (5' CAGCTTTCTTGTACAAAGTGGCA 3' und 5' ATTAGGATCCCCGGGCTG 3') und *SYBRGold™*. Über eine logarithmische Auftragung einer Vergleichssequenz konnte die Menge der F-Tag-RNA in den Zellen ermittelt werden. Bei Abwesenheit der stimulierenden Substanz resultierte eine durchschnittliche Menge von 100 Kopien pro Zelle. Die Anzahl der mRNA-Kopien stieg bis zur 60-minütigen Inkubation auf 850 Kopien pro Zelle an. Unter Berücksichtigung der Sequenzwiederholungen und dem Volumen einer HEK-Zelle ( $1.99 \cdot 10^{-12}$  l), wurde eine Konzentrationserhöhung von ca. 3.7 nM auf 32 nM mRNA innerhalb einer Stunde erreicht. Da die mRNA-Konzentration mit 32 nM für die zelluläre Anwendung von FIT-Sonden ausreichend schien und die nachfolgende Ausbildung des *mCherry*-Proteins zur eventuellen Beeinträchtigung bei der mRNA-Visualisierung führen könnte, erfolgten die Transfektionsexperimente 60 min nach der Inkubation mit 2 µg/ml Doxycyclin.

##### 4.1.5 Lebendzellexperimente mit FIT-Sonden-Konjugaten/Aggregaten

Für eine erfolgreiche Transfektion mussten zunächst verschiedene Versuchsbedingungen evaluiert werden. In einer zuvor durchgeführten Versuchsreihe in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Herrmann (HU Berlin) wurden lebende Zellen mit FIT-Sonden-Aggregaten über verschiedene Zeiträume in Opti-MEM™ und PBS inkubiert. Die Verwendung von PBS führte dabei zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal der Sonden in den Zellen. Dementsprechend wurden die Zellen in den folgenden Transfektionsexperimenten über 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Eine längere Inkubationszeit in PBS wirkte sich negativ auf die Zellviabilität aus. Für die Inkubation dienten 1 µM PNA- und 2 µM DNA-Sonde. Es folgten die Vergleichsexperimente sämtlich hergestellter Konjugate und Aggregate mit lebenden *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen.

Als Negativkontrolle diente die Inkubation der Zellen mit 2 µM **FIT-DNA1** und 1 µM **FIT-PNA1**. Hierbei konnte keine Fluoreszenzemission in den Zellen beobachtet werden (Abbildung 4.1.5.1). Die vereinzelt Signalen der **FIT-PNA1** konnten auf ungebundene Sonden im Zellmedium zurückgeführt werden.

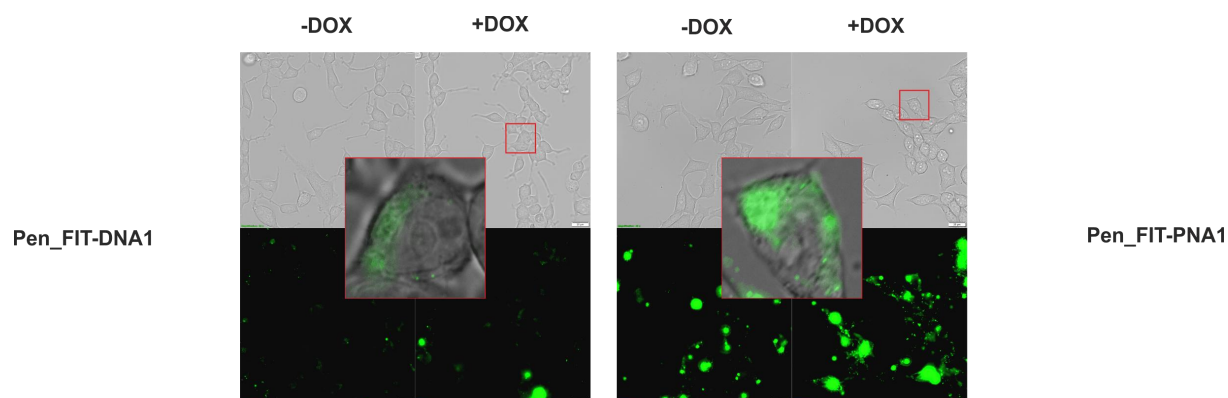
#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen



**Abbildung 4.1.5.1** Lebendzell-Fluoreszenzbilder der *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen nach Inkubation mit **FIT-PNA1**: 1  $\mu$ M und **FIT-DNA1**: 2  $\mu$ M über 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in PBS. Die Zellen wurden anschließend mit 2 x PBS gewaschen und in PBS mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden an einem inversen 60 x Ölobjektiv im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal durchgeführt. Die Stimulation erfolgte 1 h vor dem Mikroskopieren durch 2  $\mu$ g/ml Doxycyclin. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 545/40 nm. Der Kontrast wurde zur besseren Veranschaulichung nachträglich angepasst. Die Skala beträgt 20  $\mu$ m.

Die Verwendung der **Pen\_FIT-DNA1** verursachte leichte Fluoreszenzsignale innerhalb der Zellen (Abbildung 4.1.5.2). Ein Vergleich der nicht-stimulierten mit den stimulierten Zellen zeigte jedoch keinen Intensitätsunterschied der Fluoreszenz. Die **Pen\_FIT-PNA1** erreichte, trotz geringerer Konzentration, ein erhöhtes Eindringen in die Zellen. Es bildeten sich jedoch Aggregate der Sonden-Konjugate, die als helle fluoreszente Punkte zu erkennen waren. Bei genauerer Betrachtung des diffusen Fluoreszenzsignals im Zytoplasma, wurde eine erhöhte homogene Fluoreszenz in den mit Doxycyclin stimulierten Zellen beobachtet. Dies deutete auf eine erfolgreiche Aufnahme der Sonden und Hybridisierung mit der Zielsequenz hin.

Die Transfektionsmethode wäre somit für die Visualisierung von mRNA mit bekannter Lokalisation denkbar. Dennoch war die Anwendung von Penetratin für die hier durchgeführten Untersuchungen unzureichend, da die Fluoreszenzanalyse über die gesamten Zellen erfolgen sollte. Die vereinzelnden fluoreszenten Punkte würden dementsprechend die Auswertung stören.

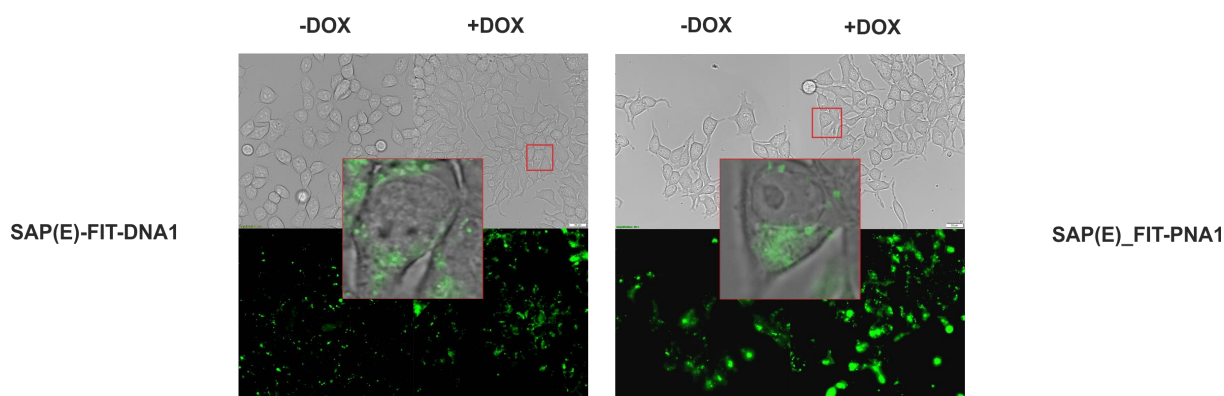


**Abbildung 4.1.5.2** Lebendzell-Fluoreszenzbilder der *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen nach Inkubation mit **Pen\_FIT-PNA1**: 1  $\mu$ M und **Pen\_FIT-DNA1**: 2  $\mu$ M über 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in PBS. Die Zellen wurden anschließend mit 2 x PBS gewaschen und in PBS mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden an einem inversen 60 x Ölobjektiv im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal durchgeführt. Die Stimulation erfolgte 1 h vor dem Mikroskopieren durch 2  $\mu$ g/ml Doxycyclin. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 545/40 nm. Der Kontrast wurde zur besseren Veranschaulichung nachträglich angepasst. Die Skala beträgt 20  $\mu$ m.



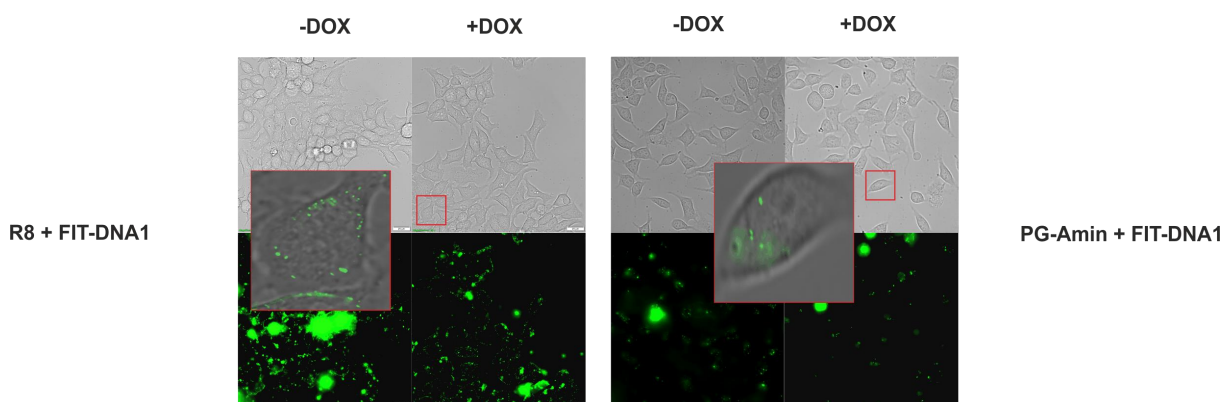
#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

Wie in Abbildung 4.1.5.3 zu erkennen, konnte durch den Einsatz von **SAP(E)\_FIT-DNA1** und **SAP(E)\_FIT-PNA1** ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenz in den Zellen erreicht werden. Dabei war eine verstärkte TO-Emission in den mit Doxycyclin stimulierten Zellen zu erkennen, wenngleich in beiden Fällen eine punktuelle Anreicherung der Konjugate nicht ausblieb. Der Einsatz von negativ geladenen CPPs schien somit ebenfalls möglich. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass der Funktionsmechanismus der zellpenetrierenden Peptide nicht ausschließlich auf der positiven Ladung der Aminosäuren basierte.



**Abbildung 4.1.5.3** Lebendzell-Fluoreszenzbilder der *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen nach Inkubation mit **SAP(E)\_FIT-PNA1**: 1 µM und **SAP(E)\_FIT-DNA1**: 2 µM über 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in PBS. Die Zellen wurden anschließend mit 2 x PBS gewaschen und in PBS mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden an einem inversen 60 x Ölobjektiv im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal durchgeführt. Die Stimulation erfolgte 1 h vor dem Mikroskopieren durch 2 µg/ml Doxycyclin. Filter: TO:  $\lambda_{ex}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{em}$  = 545/40 nm. Der Kontrast wurde zur besseren Veranschaulichung nachträglich angepasst. Die Skala beträgt 20 µm.

Die mit dem **R8 + FIT-DNA1**-Aggregat inkubierten Zellen zeigten eine hohe Fluoreszenzintensität, wobei der Einschluss der Sonden in den Endosomen ein homogenes Fluoreszenzmuster in den Zellen verhinderte (Abbildung 4.1.5.4). Der Überschuss an Peptid schränkte möglicherweise die Mobilität der Sonden innerhalb des Zytosols ein und verhinderte dementsprechend die Hybridisierung.

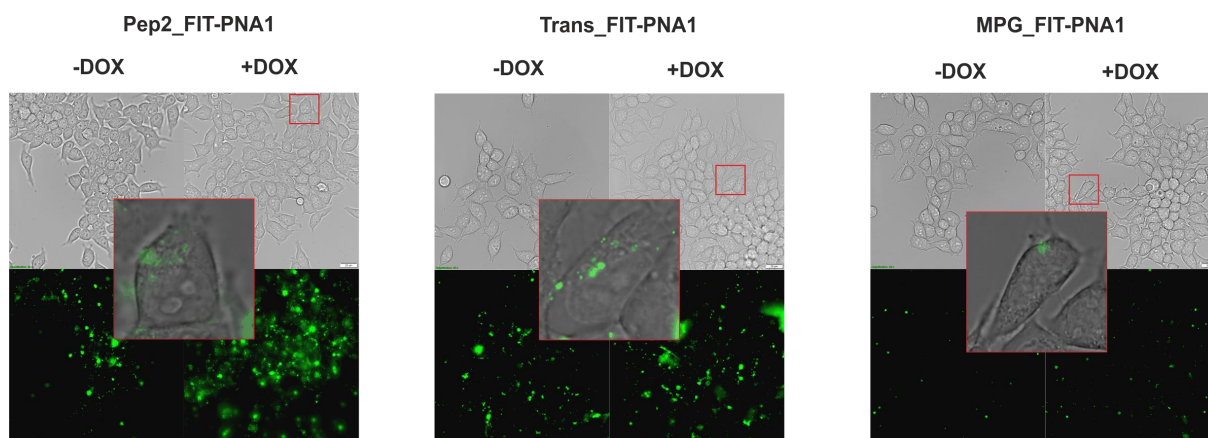


**Abbildung 4.1.5.4** Lebendzell-Fluoreszenzbilder der *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen nach Inkubation mit **R8 + DNA1** und **PG-Amin + DNA1**: 2 µM über 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in PBS. Die Zellen wurden anschließend mit 2 x PBS gewaschen und in PBS mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden an einem inversen 60 x Ölobjektiv im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal durchgeführt. Die Stimulation erfolgte 1 h vor dem Mikroskopieren durch 2 µg/ml Doxycyclin. Filter: TO:  $\lambda_{ex}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{em}$  = 545/40 nm. Der Kontrast wurde zur besseren Veranschaulichung nachträglich angepasst. Die Skala beträgt 20 µm.

#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

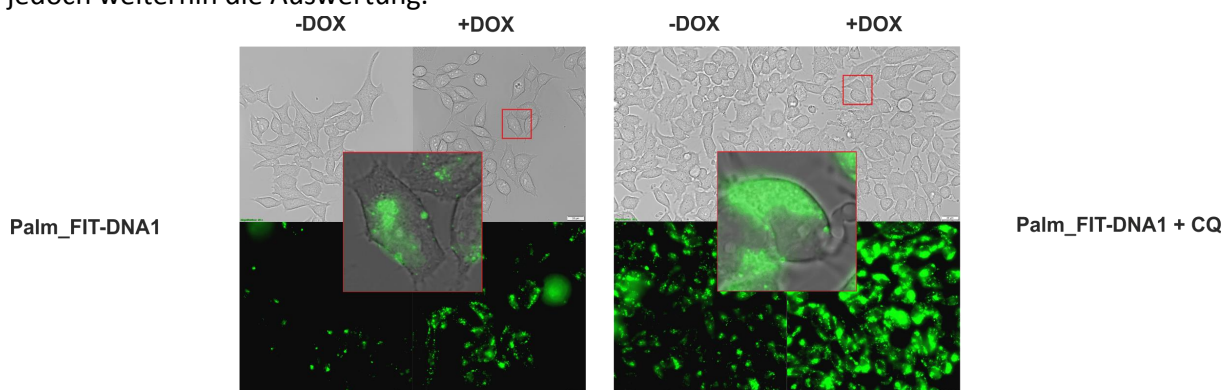
Trotz geringerer Effizienz des **PG-Amin + FIT-DNA1** konnte im Gegensatz zu den Aggregaten mit **R8** eine leichte, gleichmäßige Fluoreszenz beobachtet werden. Eine Intensitätserhöhung war nach der Stimulation der Zellen dennoch nicht zu erkennen.

Die mit **Pep2\_FIT-PNA1** und **Trans\_FIT-PNA1** inkubierten Zellen zeigten leichte Fluoreszenzsignale im Zellinneren, mit einer leicht erhöhten diffusen TO-Emission in den stimulierten Zellen (Abbildung 4.1.5.5). **MPG\_FIT-PNA1** schien hingegen kaum die Zellmembran zu passieren, weshalb nur vereinzelt Fluoreszenzsignale detektiert werden konnten.



**Abbildung 4.1.5.5** Lebendzell-Fluoreszenzbilder der *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen nach Inkubation mit **Pep2\_FIT-PNA1**, **Trans\_FIT-PNA1** und **MPG\_FIT-PNA1**: 1  $\mu\text{M}$  über 30 min bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  in PBS. Die Zellen wurden anschließend mit 2 x PBS gewaschen und in PBS mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden an einem inversen 60 x Öljektiv im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal durchgeführt. Die Stimulation erfolgte 1 h vor dem Mikroskopieren durch 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Doxycyclin. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ . Der Kontrast wurde zur besseren Veranschaulichung nachträglich angepasst. Die Skala beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

Bei Betrachtung eines Lipid-basierten Systems (**Palm\_FIT-DNA1**) wurde ein erhöhtes Signal der TO-Emission in den stimulierten Zellen klar erkenntlich (Abbildung 4.1.5.6). Die Zugabe von Chloroquin, einem Chininderivat, führte durch das Aufschließen der Endosomen zu einer stark erhöhten TO-Emission in den Zellen.<sup>[81, 102]</sup> Die punktuellen Anhäufungen der Sonden erschwerten jedoch weiterhin die Auswertung.

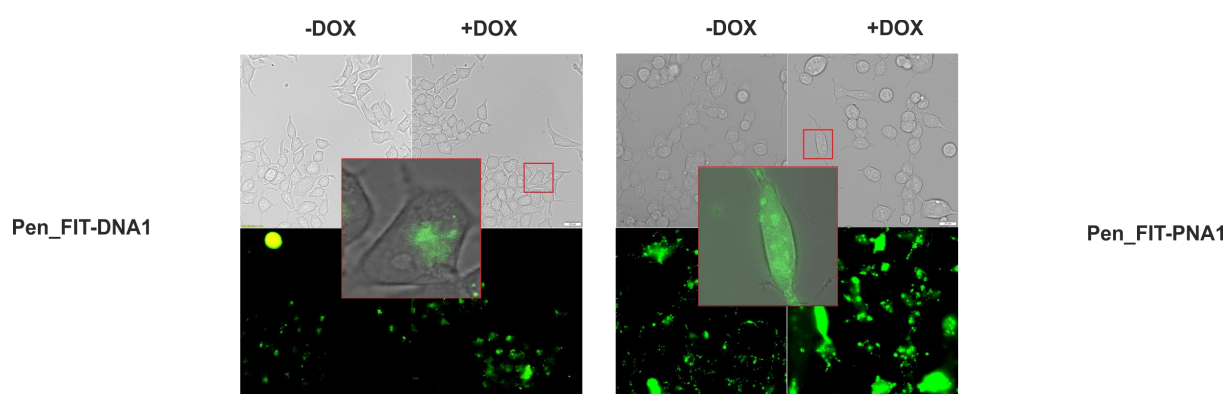


**Abbildung 4.1.5.6** Lebendzell-Fluoreszenzbilder der *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen nach Inkubation mit **Palm\_FIT-DNA1** und **Palm\_FIT-DNA1+CQ**: 2  $\mu\text{M}$  und Chloroquin: 500  $\mu\text{M}$  über 30 min bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  in PBS. Die Zellen wurden anschließend mit 2 x PBS gewaschen und in PBS mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden an einem inversen 60 x Öljektiv im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal durchgeführt. Die Stimulation erfolgte 1 h vor dem Mikroskopieren durch 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Doxycyclin. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ . Der Kontrast wurde zur besseren Veranschaulichung nachträglich angepasst. Die Skala beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

Um der Ursache auf den Grund zu gehen und negative Effekte des Puffers auszuschließen, wurden die Zellen in einem zweiten Ansatz in phenolrotfreiem DMEM über Nacht inkubiert. Dafür wurden die Zellen zunächst mit phenolrotfreiem DMEM gewaschen und anschließend mit den Sonden in phenolrotfreiem DMEM bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert. Da eine längere Inkubationszeit eine geringere Sondenmenge bedingte, konnte die PNA-Konzentration auf 250 nM und die DNA-Konzentration auf 1 µM reduziert werden. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 1 h vor dem Mikroskopieren mit 2 µg/ml Doxycyclin stimuliert und abermals mit PBS gewaschen, um überschüssige Sonde zu entfernen.

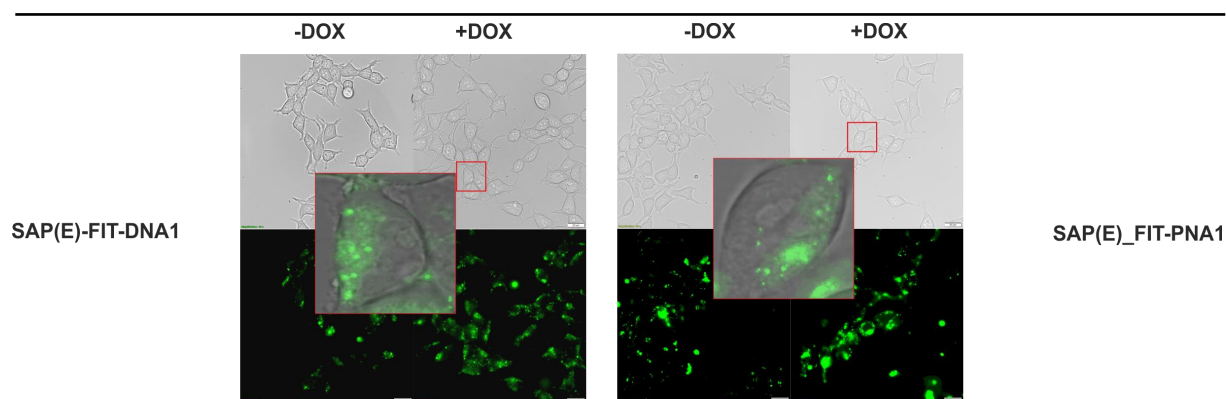
Die Inkubation mit der **Pen\_FIT-DNA1** über Nacht bewirkte, im Vergleich zur 30 min Inkubation, eine erhöhte Sondenaufnahme durch die Zellen (Abbildung 4.1.5.7). Dabei war ein Anstieg der TO-Emission nach der Stimulation zu erkennen. Gleiches wurde bei der Inkubation mit der **Pen\_FIT-PNA1** beobachtet. Hier war eine deutliche TO-Emissionssteigerung nach der Behandlung mit Doxycyclin ersichtlich. Trotz einer gleichmäßigeren Verteilung der Sonden blieben vereinzelnde fluoreszente Aggregate in den Zellen bestehen.



**Abbildung 4.1.5.7** Lebendzell-Fluoreszenzbilder der *Flp-In*<sup>TM</sup> 293 *T-REx*<sup>TM</sup>-Zellen nach Inkubation mit **Pen\_FIT-PNA1**: 0.25 µM und **Pen\_FIT-DNA1**: 1 µM über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in phenolrotfreiem DMEM. Die Zellen wurden anschließend mit 2 x PBS gewaschen und in PBS mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden an einem inversen 60 x Ölobjectiv im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal durchgeführt. Die Stimulation erfolgte 1 h vor dem Mikroskopieren durch 2 µg/ml Doxycyclin. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ . Der Kontrast wurde zur besseren Veranschaulichung nachträglich angepasst. Die Skala beträgt 20 µm.

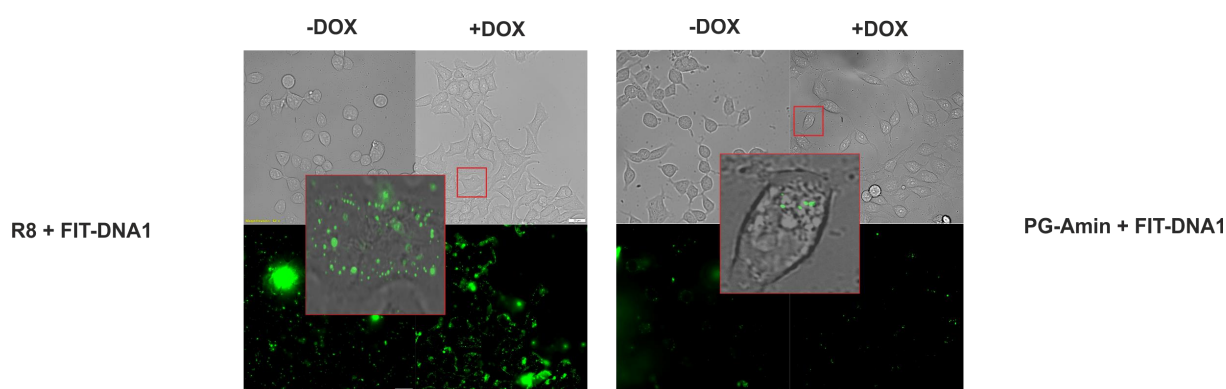
Wie die Mikroskopiebilder in Abbildung 4.1.5.8 zeigen, führte die Behandlung mit **SAP(E)\_FIT-DNA1** als auch **SAP(E)\_FIT-PNA1** über Nacht zu leicht verstärkten Signalen. Eine längere Inkubationszeit schien die Aufnahme der Sonden durch die Zellen zu fördern. Es wurden jedoch weiterhin punktuelle Ansammlungen der Sonde beobachtet.

#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen



**Abbildung 4.1.5.8** Lebendzell-Fluoreszenzbilder der *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen nach Inkubation mit **SAP(E)-FIT-PNA1**: 0.25  $\mu\text{M}$  und **SAP(E)-FIT-DNA1**: 1  $\mu\text{M}$  über Nacht bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  in phenolrotfreiem DMEM. Die Zellen wurden anschließend mit 2 x PBS gewaschen und in PBS mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden an einem inversen 60 x Ölobjektiv im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal durchgeführt. Die Stimulation erfolgte 1 h vor dem Mikroskopieren durch 2  $\mu\text{g/ml}$  Doxycyclin. Filter:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 545/40 nm. Der Kontrast wurde zur besseren Veranschaulichung nachträglich angepasst. Die Skala beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

Das **R8 + FIT-DNA1**-Aggregat verblieb auch nach der Inkubation über Nacht in der Zellmembran, wobei hier die längere Exposition der Zellen in DMEM, anders als bei den Peptiden zuvor, zu einer Erniedrigung der Sondaufnahme führte (Abbildung 4.1.5.9). Gleiches wurde bei der Transfektion mit dem PG-Amin beobachtet. Auch hier schien das Medium einen negativen Einfluss auf die Sondaufnahme auszuüben.

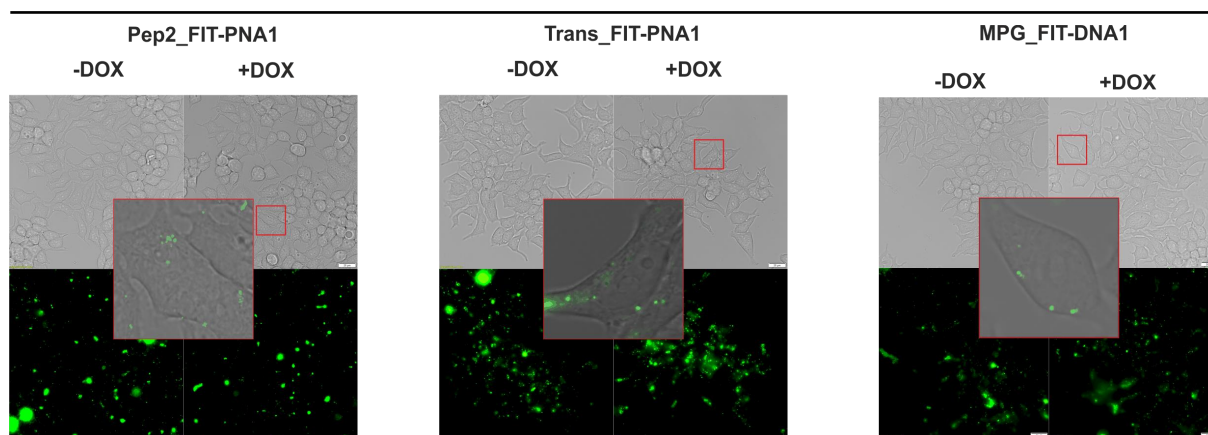


**Abbildung 4.1.5.9** Lebendzell-Fluoreszenzbilder der *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen nach Inkubation mit **R8 + DNA1** und **PG-Amin + DNA1**: 1  $\mu\text{M}$  über Nacht bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  in phenolrotfreiem DMEM. Die Zellen wurden anschließend mit 2 x PBS gewaschen und in PBS mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden an einem inversen 60 x Ölobjektiv im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal durchgeführt. Die Stimulation erfolgte 1 h vor dem Mikroskopieren durch 2  $\mu\text{g/ml}$  Doxycyclin. Filter:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 545/40 nm. Der Kontrast zur besseren Veranschaulichung wurde nachträglich angepasst. Die Skala beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

Im Fall der **Trans-FIT-PNA1**, **MPG\_PNA-FIT1** und **Pep2-FIT-PNA1** war gleichermaßen eine verringerte TO-Emission erkennbar (Abbildung 4.1.5.10). Die **Trans-FIT-PNA1** zeigte nach der Zugabe von Doxycyclin einen minimalen Anstieg der Fluoreszenz. Hauptsächlich konnten die Konjugate jedoch nur als fluoreszente Punkte in den Zellen visualisiert werden. Die Freisetzung aus den Endosomen war kaum ersichtliche.



## 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen



**Abbildung 4.1.5.10** Lebendzell-Fluoreszenzbilder der *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen nach Inkubation mit **Pep2\_FIT-PNA1**, **Trans\_FIT-PNA1** und **MPG\_FIT-PNA1**: 0.25 µM über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in phenolrotfreiem DMEM. Die Zellen wurden anschließend mit 2 x PBS gewaschen und in PBS mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden an einem inversen 60 x Ölobjektiv im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal durchgeführt. Die Stimulation erfolgte 1 h vor dem Mikroskopieren durch 2 µg/ml Doxycyclin. Filter: TO:  $\lambda_{ex} = 500/24$  nm,  $\lambda_{em} = 545/40$  nm. Der Kontrast wurde zur besseren Veranschaulichung nachträglich angepasst. Die Skala beträgt 20 µm.

Es lässt sich zusammenfassen, dass DNA- sowie PNA-FIT-Sonden, durch eine kovalente Verknüpfung oder Aggregation mit zellpenetrierenden Peptiden, in der Lage waren die Biomembran lebender Zellen zu durchdringen. Eine längere Inkubationszeit führte nur in einigen Fällen zu einer erhöhten Sondenaufnahme. Es lagen jedoch in den meisten Fällen punktuelle Anhäufungen der FIT-Sonden vor, welche die Auswertung der Fluoreszenzsignale erschwerten. Auch wenn sich ein Teil der Sonden aus den Endosomen befreite und mit der Zielsequenz hybridisierte, so konnten keine zuverlässig auswertbaren Bilder erhalten werden. Demensprechend könnten die hier verwendeten Konjugate und Aggregate zum Transport von Wirkstoffen, bzw. funktionalen Molekülen, jedoch nicht zur mRNA-Visualisierung in lebenden Zellen eingesetzt werden.

### 4.1.6 Elektroporationsexperimente mit FIT-Sonden

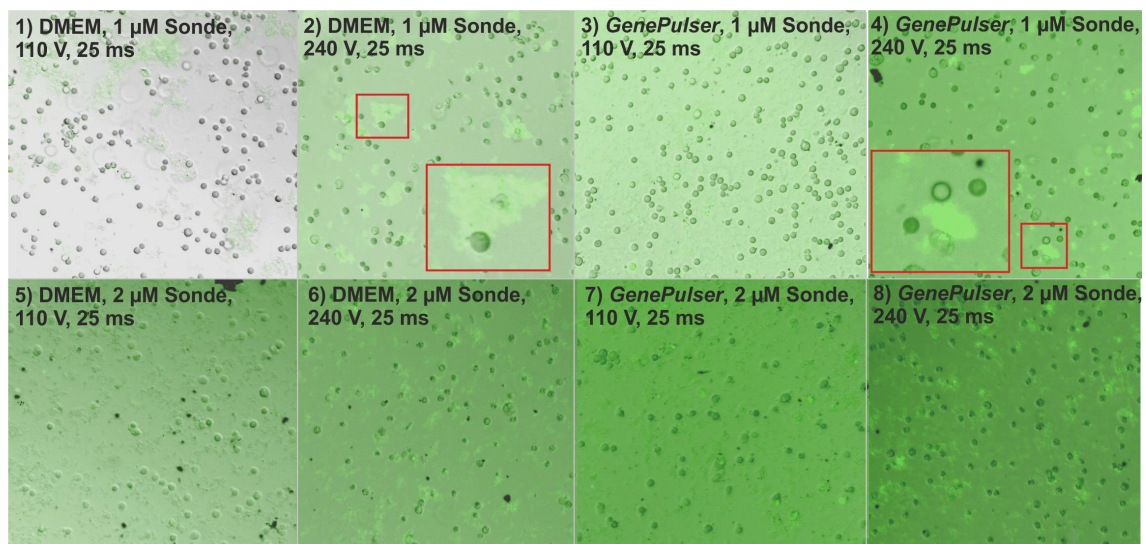
Die Elektroporation ist eine physikalische Methode der Transfektion, bei der die Moleküle durch eine vorübergehend permeabilisierte Biomembran ins Zellinnere eindringen können. Durch das Ausbleiben einer Interaktion zwischen Sonde und den Transfektionsmolekülen sollten punktuelle Ansammlungen der Sonde bzw. fluoreszente Aggregate unterbunden werden. Die nachfolgenden Experimente wurden an einem *GenePulser®*-Elektroporator der Firma *BioRad* und zweier verschiedener Elektroporationsbedingungen mit der **FIT-DNA1** durchgeführt. Die Geräteeinstellungen ergaben sich aus den Protokollen von *Biorad* und bereits vorhandenen Publikationen.<sup>[103]</sup>

#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

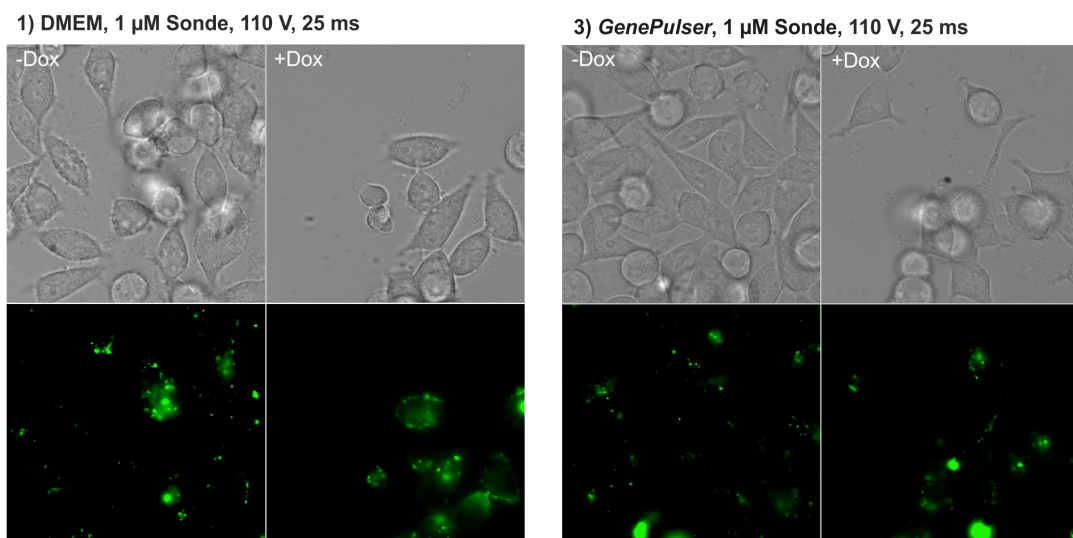
Folgende Bedingungen wurden verwendet: Bedingung a (ein Puls mit einer Spannung von 110 V und einer Pulsdauer von 25 ms) sowie Bedingung b (ein Puls mit einer Spannung von 240 V und 25 ms Pulsdauer). Da im vorangegangenen Kapitel gezeigt werden konnte, dass auch das Zellmedium einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat, wurde die Elektroporation sowohl in phenolrotfreiem DMEM als auch in *GenePulserXCell*<sup>®</sup>-Elektroporationspuffer durchgeführt. Es wurden jeweils 1  $\mu$ M und 2  $\mu$ M der **FIT-DNA1** eingesetzt.

Vor dem Beginn der Elektroporation wurden die Zellen durch die Behandlung mit Trypsin vom Boden der Kulturflaschen abgelöst und unter den angegebenen Einstellungen elektroporiert. Die Zellen wurden anschließend in ein mit phenolrotfreiem DMEM gefülltes 8-Kammer-Objektiv von *Ibidi* überführt. Abbildung 4.1.6 A zeigt die Mikroskopiebilder der Zellen direkt nach der Elektroporation im Hellfeld- und Fluoreszenzkanal.

A)



B)



**Abbildung 4.1.6** A) Überlagerte Hellfeld- und Fluoreszenzbilder nach der Elektroporation der *Flp-In*<sup>TM</sup> 293 *T-REx*<sup>TM</sup>-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von **FIT-DNA1**, gemessen an einem 10 x Objektiv. B) Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen 24 h nach der Elektroporation und 1 h nach Stimulation mit 2  $\mu$ g/ml Doxycyclin. Die Messung erfolgte an einem 60 x Ölobjektiv. Die Skala im 10 x Objektiv beträgt 100  $\mu$ m und im 60 x Ölobjektiv 20  $\mu$ m. Filter: TO:  $\lambda_{ex}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{em}$  = 545/40 nm

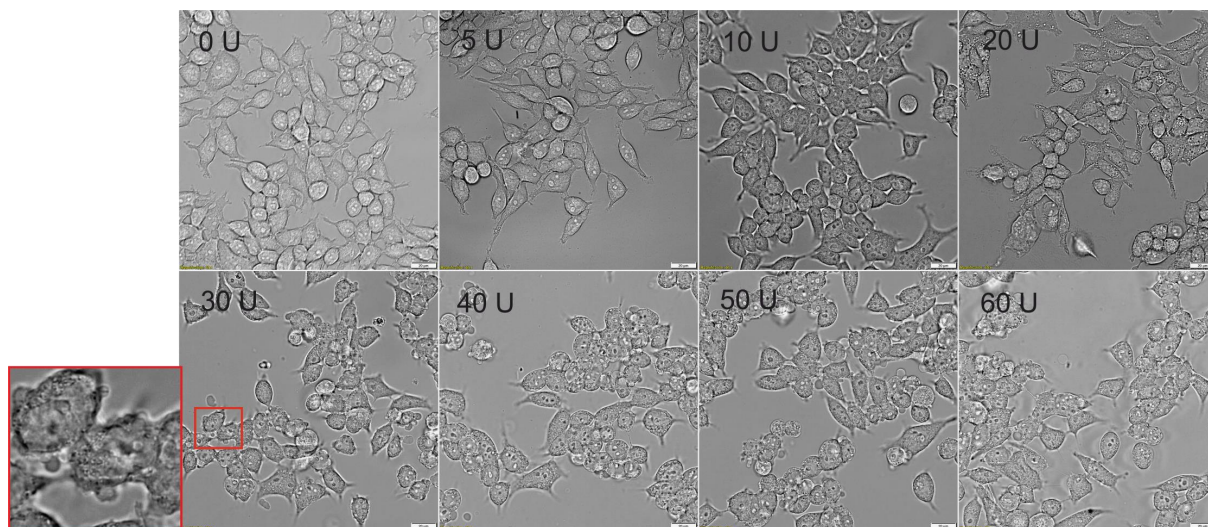
#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

Die Zellen schienen die Elektroporation mit 1  $\mu$ M **FIT-DNA1** unter der Bedingung a unbeschadet zu überstehen. Sowohl die Verwendung von phenolrotfreiem DMEM als auch *GenePulser*<sup>®</sup> deuteten zunächst auf eine gleichermaßen gute Verträglichkeit für die Zellen hin. Eine erhöhte Spannung von 240 V (Bedingung b) sowie eine erhöhte Sondenkonzentration von 2  $\mu$ M, wirkten sich dagegen negativ auf die Zellen aus. Hier wurden vermehrt schwimmende Zellfragmente (rot markiert) an der Oberfläche beobachtet. Durch das vorangehende Trypsinieren rundeten sich die Zellen zudem stärker ab. Somit war eine erhöhte Dauer bis zum Absetzen der Zellen erforderlich, wobei selbst nach 8 h die Zellen stets in Suspension vorlagen. Aus diesem Grund wurden die Proben für das vollständige Absetzen über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in phenolrotfreiem DMEM gelagert. Am darauffolgendem Tag wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen, um überschüssige Zellfragmente zu entfernen. Infolge der beeinträchtigten Zelladhäsion konnte die Stimulation lediglich in Kammer 1) und Kammer 3) mit 2  $\mu$ g/ml Doxycyclin für 1 h durchgeführt werden. In den restlichen Kammern lagen unzureichend Zellen dafür vor. Abbildung 4.1.6 B zeigt die Zellen aus der Kammer 1) und 2) vor und nach der Stimulation mit Doxycyclin. In beiden Kammern waren stets abgerundete Zellen vorhanden, wobei in Kammer 1) eine Intensitätssteigerung nach der Stimulation deutlich wurde. Die Emission war als leicht diffuse Fluoreszenz im Zytosol zu erkennen, wenngleich eine geringe Anzahl an Aggregaten vorlag. Die Zellen in Kammer 3) zeigten hingegen kaum einen Anstieg der TO-Emission nach der Stimulation. Die Sonden schienen in den Endosomen eingeschlossen zu sein. Da nicht einmal die DNA-basierten FIT-Sonden, trotz besserer Löslichkeit und Fluoreszenzeigenschaften, erfolgsversprechende Ergebnisse lieferten, wurde auf die Elektroporation mit den PNA-FIT-Sonden im Folgenden verzichtet.

In der Vergangenheit konnten HEK-293-Zellen bereits erfolgreich elektroporiert werden.<sup>[103]</sup> Die Bedingungen hatten jedoch meist einen starken Einfluss auf die Viabilität der Zellen, weshalb unterschiedliche Änderungen im Geräteaufbau von Elektroporatoren die Handhabung mit adhären Zellen erleichtern sollten.<sup>[104]</sup> Zudem könnte die hier vorliegende genetische Modifikation der HEK-293-Zellen zu einer Veränderung der Eigenschaften geführt haben, die das Elektroporieren zusätzlich erschwerte. Letztendlich war die Methode der Elektroporation durch die aufwendige Vorbereitung, das zusätzliche Trypsinieren und der langen Regenerationsphase der Zellen nicht für den Gebrauch mit *Flp-In*<sup>TM</sup> 293 *T-REx*<sup>TM</sup>-Zellen geeignet.

### 4.1.7 Permeabilisierung mit Streptolysin-O

Eine weitere Möglichkeit der Transfektion bot die Verwendung eines Enzyms. Das Streptolysin-O (SLO) ist ein bakterielles Toxin, welches temporär Poren in der Zellmembran bildet.<sup>[105]</sup> Für die Transfektionsversuche wurde das Enzym vorab in RNase-freiem Wasser gelöst und in 250 U/10 µl Aliquot maximal 12 Monate bei -80 °C gelagert. Das Enzym wurde vor der direkten Anwendung mit Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) über 30 min bei 37 °C reduziert.



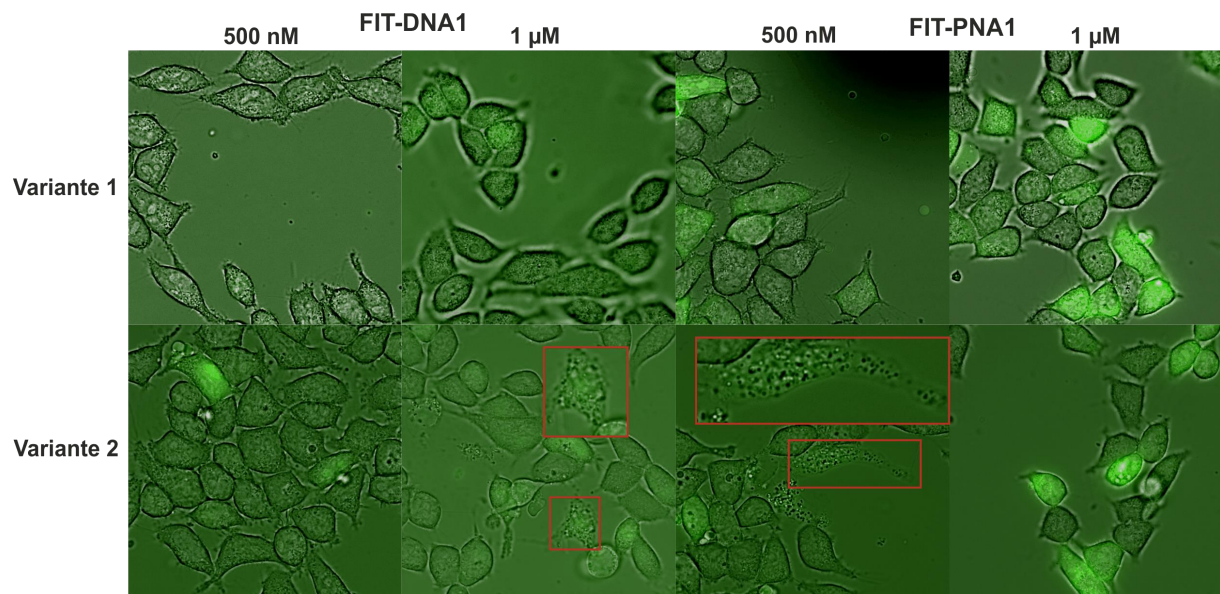
**Abbildung 4.1.7.1** Hellfeldbilder aufgenommen an einem 60 x Ölobjectiv nach Inkubation der *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an SLO (angegeben in Units) über 10 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> in Lebendzellpuffer (PBS + 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0). Die Aufnahmen erfolgten in phenolrotfreiem DMEM. Die Skala beträgt 20 µm.

Zur Abschätzung der nötigen Konzentration an Enzym wurden die Zellen zunächst mit verschiedenen Mengen an SLO in Lebendzellpuffer (PBS + 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) für 10 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch anschließendes Waschen der Zellen wurde das überschüssige SLO entfernt. In Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten SLO bildeten sich Bläschen an der Zellmembranoberfläche (Abbildung 4.1.7.1). Die Bildung der Bläschen deutete auf eine Schutzreaktion der Zelle hin, durch deren Isolation sich die Zelle vor weiteren Schäden schützte.<sup>[105]</sup> Demzufolge war die optimale Menge SLO diejenige, bei der die Permeabilisierung der Membran ohne Auswirkungen auf die Zellviabilität eingeleitet wurde. Es zeigte sich, dass mit einer Menge von 30 U SLO in 200 µl Lebendzellpuffer erste Zeichen einer Bläschenbildung an der Membran zu erkennen waren. Bei einer Erhöhung der SLO-Menge nahm die Anzahl der toten Zellen gleichermaßen zu. Somit schienen 30 U/200 µl für diese Anwendung optimal. Zur Untersuchung der passenden Bedingungen wurden zwei verschiedene Varianten der Permeabilisierung getestet. In der Variante 1 wurde das SLO zunächst mit TCEP für 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> reduziert. Anschließend wurden die Zellen mit 30 U SLO und verschiedenen Mengen an



#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

PNA- und DNA-Sonde in Leibenzellpuffer über einen Zeitraum von 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mit PBS gewaschen und 1 h in Belebungsmedium (DMEM, 10% FBS, 2 mM ATP, 2 mM GTP) gelagert. Es resultierte bereits eine erhöhte Fluoreszenzemission bei 1  $\mu$ M **FIT-DNA1** und 500 nM **FIT-PNA1** (Abbildung 4.1.7.2).

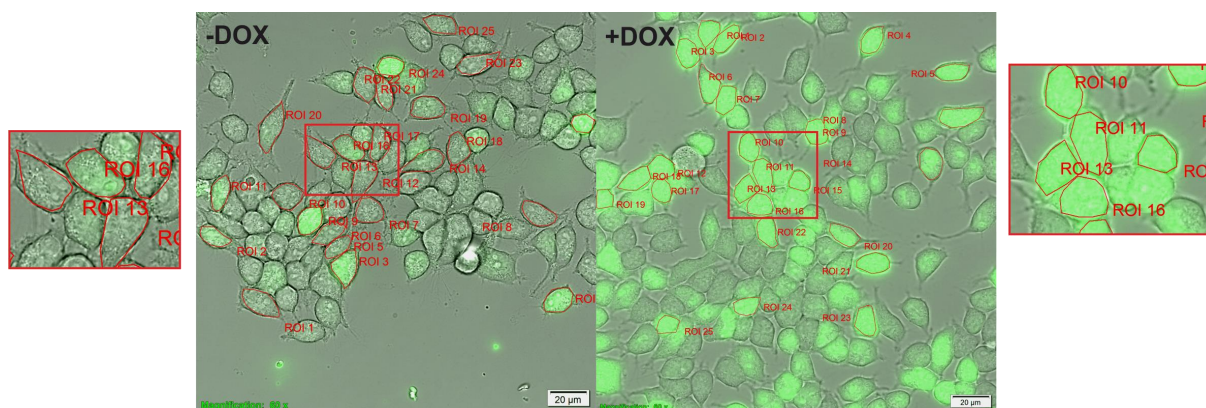


**Abbildung 4.1.7.2** Überlagerte Hellfeld- und Fluoreszenzbilder der *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen nach Behandlung mit 500 nM **FIT-PNA1** und 1  $\mu$ M **FIT-DNA1** durch Variante 1 und 2. Die Aufnahmen wurden an einem 60 x Ölobjektiv durchgeführt. Die toten Zellen sind rot markiert. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 545/40 nm.

In der Variante 2 wurde die Zellmembran zunächst 10 min mit SLO permeabilisiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit den Sonden für 5 min in Tyrodes-Puffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, pH 7.4) auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden abermals mit PBS gewaschen und 1 h in Belebungsmedium bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  stehen gelassen. Es zeigte sich bereits bei einer Menge von 500 nM **FIT-DNA1** ein Fluoreszenzsignal in den Zellen, wobei der Anteil der beschädigten bzw. toten Zellen vergleichsweise hoch lag. Diese sind in der Abbildung 4.1.7.2 rot umrandet.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Variante 1 für die Optimierung der Experimente besser geeignet war, da die Bedingungen nicht zu irreversiblen Schäden an der Membran führten. Für die Auswertung der Fluoreszenzemission wurden nur die Zellen mit sichtbarer Fluoreszenzemission und unveränderter Zellmorphologie ausgewählt. In Abbildung 4.1.7.3 ist das Prinzip der Auswertung dargestellt, wobei die Fluoreszenzwerte in den nachfolgenden Experimenten manuell durch Umkreisen der Zellen erhalten wurden.

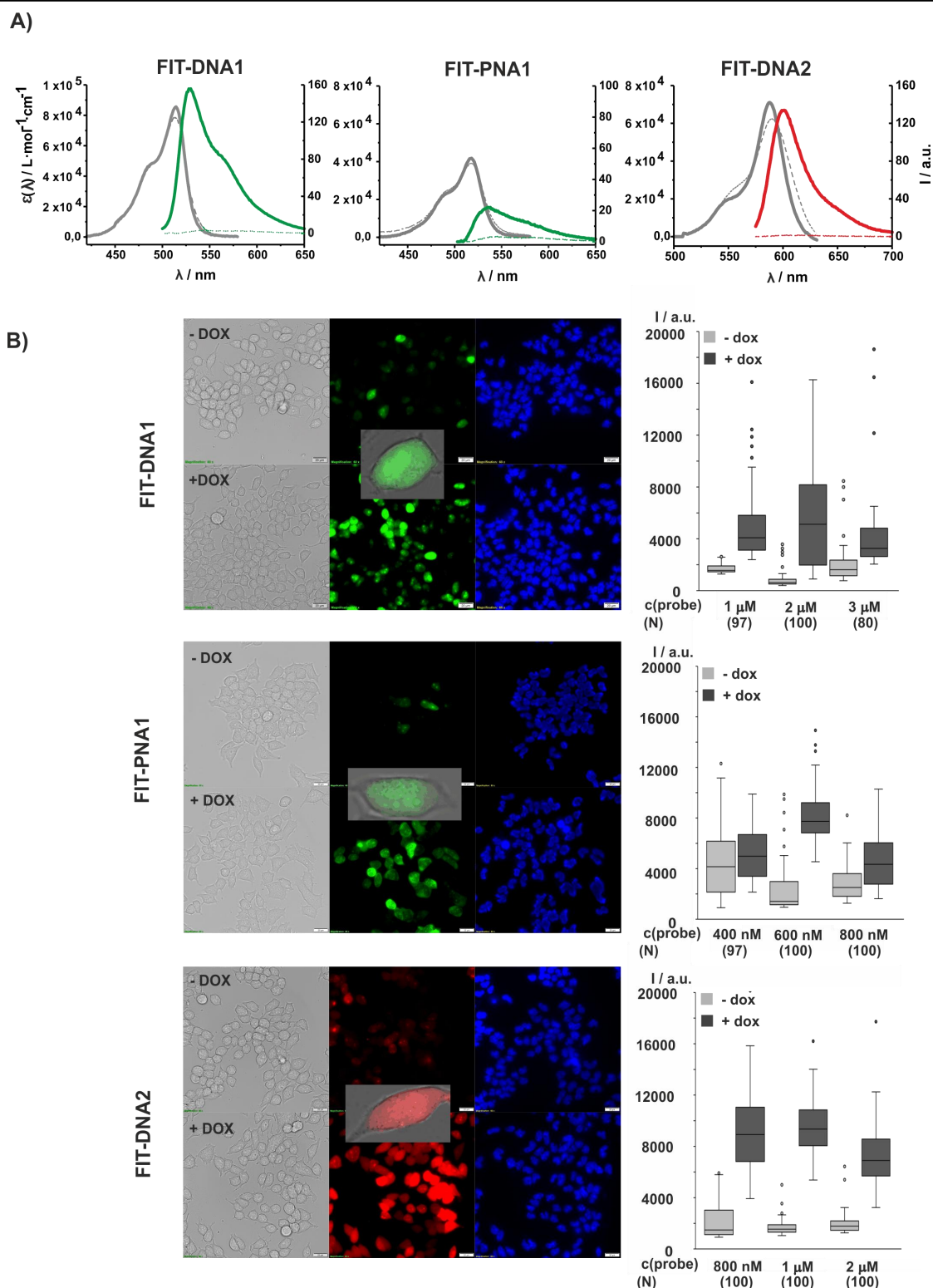
#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen



**Abbildung 4.1.7.3** Überlagerte Hellfeld- und Fluoreszenzbilder des Auswertungsprinzips durch ROI (*region of interest*), bei der die *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen manuell umkreist und anschließend die Durchschnittsfluoreszenzintensität ausgewertet wurde. Grün = TO-Emission. Filter: TO:  $\lambda_{ex} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 545/40 \text{ nm}$ . Die Skala beträgt  $20 \mu\text{m}$ .

Vor dem Beginn der Experimente wurde eine weitere DNA-basierte FIT-Sonde, die **FIT-DNA2** (ATGCACG-Ser(CB)-C<sub>L</sub>CG), hergestellt. Diese war komplementär zum 3'-Ende der F-Tag-RNA aufgebaut (5' UAA UCA ACG GCC **GGA CGU GCA U** 3'). Die dazugehörigen Absorption- und Emissionsspektren sind in Abbildung 4.1.7.4 A dargestellt. Es folgte die Inkubation der Zellen mit jeweils einer der drei Sonden. Die Fluoreszenzbilder zeigten eine homogene Fluoreszenzemission innerhalb der Zellen. Es wurden Zellen mit einer höheren aber auch niedrigeren Fluoreszenzintensität beobachtet (Abbildung 4.1.7.4 B). Für die Berechnung der Durchschnittsintensität wurden jeweils 50 Zellen pro Experiment analysiert. Die Unterschiede könnten auf variierende mRNA-Level oder eine inhomogene Permeabilisierung der Zellmembran zurückzuführen sein. Die **FIT-DNA1** wurde in einer  $1 \mu\text{M}$ ,  $2 \mu\text{M}$  und  $3 \mu\text{M}$  Konzentration eingesetzt. Ein Optimum der **FIT-DNA1**-Responsivität wurde mit einer  $2 \mu\text{M}$  Konzentration erreicht (Abbildung 4.1.7 B). Es konnte demnach eine über 400%-Steigerung der TO-Emission in den stimulierten Zellen beobachtet werden. Die Inkubation mit der **FIT-PNA1** erfolgte mit einer Konzentration von  $200 \text{ nM}$ ,  $600 \text{ nM}$  und  $800 \text{ nM}$ . Die Sondenkonzentration von  $600 \text{ nM}$  erreichte dabei die höchste Responsivität, mit einem Anstieg von ca. 400%. Auch hier bedingte eine erhöhte Konzentration der Sonde ein erhöhtes Fluoreszenzsignal, unabhängig von der Responsivität. Die Verwendung einer weiteren, CB-markierten **FIT-DNA2**, bestätigte die Anwendbarkeit der Methode auch für andere Cyaninfarbstoffe. Da die **FIT-DNA2** in der Küvette eine 113-fache Emissionssteigerung nach Zugabe der RNA-Zielsequenz erreichte, sollte eine verbesserte Responsivität im Gegensatz zur **FIT-DNA1** in den Zellen zu erwarten sein. Bereits eine Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  **FIT-DNA2** liefert eine um 450% höhere CB-Emission in den stimulierten Zellen. Diese war somit 11% höher als die der **FIT-DNA1**. Die genauen Fluoreszenzanstiege für jede Sonde sind in Abbildung 4.1.7.4 B in einem Box-Diagramm dargestellt.

## 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen



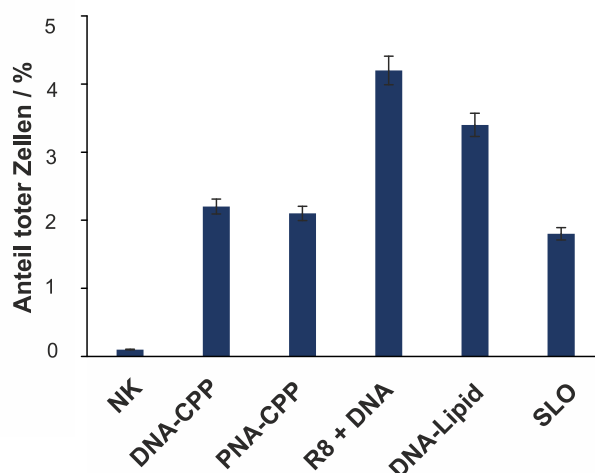
**Abbildung 4.1.7.4** A) Darstellung der Absorptions-(gestrichelt) und Emissionsspektren (durchgezogen) von **FIT-DNA1**, **FIT-PNA1** und **FIT-DNA2**. Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7) bei 37 °C. TO:  $\lambda_{ex}$  = 485 nm,  $\lambda_{em}$  = 500 - 650 nm, CB:  $\lambda_{ex}$  = 650 nm,  $\lambda_{em}$  = 575 - 700 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm. B) Lebendzell-Fluoreszenzbilder von *Flp-In*<sup>TM</sup> 293 *T-REx*<sup>TM</sup>-Zellen nach Inkubation mit der jeweiligen Sonden und 30 U SLO in Lebendzellpuffer (PBS + 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Belichtungsdauer zwischen 200 ms und 1 s. Grün = TO-Emission; Rot = CB-Emission; Blau = Hoechst 33342. Filter: TO:  $\lambda_{ex}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{em}$  = 545/40 nm; CB:  $\lambda_{ex}$  = 575/25 nm,  $\lambda_{em}$  = 628/40 nm; Hoechst 3334:  $\lambda_{ex}$  = 438/24 nm,  $\lambda_{em}$  = 483/32 nm. Die Skala beträgt 20  $\mu$ m. N= Anzahl analysierter Zellen.

### 4.1.8 Viabilitätsmessungen

Bei der Lebendzell-Bildgebung ist die Viabilität der zu messenden Zellen für die Qualität der Ergebnisse entscheidend. Zellulärer Stress kann sowohl die Menge an mRNA als auch Proteinen in den Zellen beeinflussen.<sup>[106]</sup> Aus diesem Grund sollten die zellpenetrierenden Peptide, Lipide, und das Streptolysin-*O* auf ihre Toxizität untersucht werden. Die Elektroporation wurde hierbei ausgelassen, da die meisten Zellen nach der Prozedur gewaschen wurden und somit die Ermittlung eines zuverlässigen Wertes nicht möglich war. Durch den Einsatz von Propidiumiodid (PI) wurde der Zustand der Zellmembran nach der Transfektion geprüft. PI ist ein Farbstoff, der die Membran beschädigter Zellen permeabilisiert und daraufhin Fluoreszenz emittiert.

Für die Viabilitätsprüfung wurden die verbliebenen Zellen nach der jeweiligen Transfektionsbehandlung mit 1 µg/ml Propidiumiodid für 5 min bei 37 °C in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der Zellkern mit Hoechst 33342 angefärbt. Die Anzahl aller mit Propidiumiodid angefärbten Zellen, geteilt durch die Gesamtanzahl der über die Zellkernfärbung ermittelten Zellen, wurde in Abbildung 4.1.8 in einem Balkendiagramm dargestellt.

Als Referenz diente eine negative Kontrolle (NK), bei der eine Behandlung der Zellen für 30 min in PBS stattfand. Es war deutlich zu erkennen, dass der Anteil toter Zellen unabhängig von der verwendeten Methode gering ausfiel. Das **R8 + FIT-DNA1**-Aggregat wies dabei die höchste Toxizität mit über 4% toter *Flp-In*<sup>TM</sup> 293 *T-REx*<sup>TM</sup>-Zellen auf, gefolgt von der **Palm\_FIT-DNA1** mit über 3%. Entscheidend war die geringe Toxizität der SLO-Behandlung (< 2%), die demzufolge für die Verwendung mit den *Flp-In*<sup>TM</sup> 293 *T-REx*<sup>TM</sup>-Zellen geeignet war.



**Abbildung 4.1.8** Balkendiagramm mit prozentualer Angabe der toten Zellen nach der Behandlung der Zellen mit der jeweiligen Transfektionsmethode. Es wurden 100 - 180 Zellen pro Methode ausgewertet. NK = negativ Kontrolle.

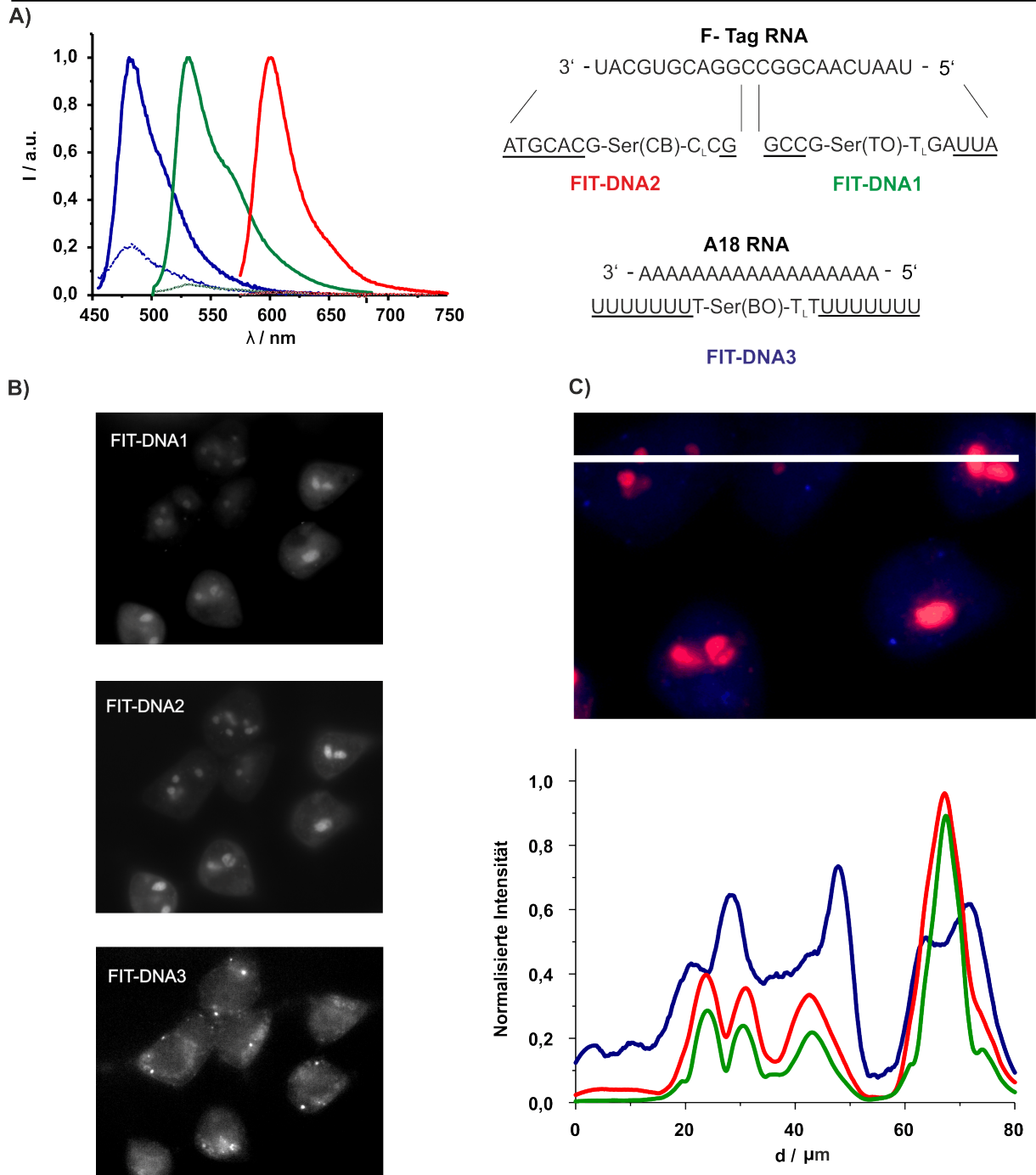
---

### 4.1.9 Lebendzell-Mehrfarben-Bildgebung mit BO-, TO- und CB-FIT-Sonden

Nach der Optimierung der Sondenaufnahme durch lebende *Flp-In*<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>-Zellen sollte der simultane Einsatz von drei verschiedenen FIT-Sonden mit unterschiedlichen Farbstoffen erfolgen. Dafür diente eine TO-markierte **FIT-DNA1**, eine CB-markierte **FIT-DNA2** und eine BO-markierte **FIT-DNA3** (Abbildung 4.1.9 A). Die **FIT-DNA1** und **FIT-DNA2** waren in benachbarter Position, komplementär zur F-Tag-RNA aufgebaut. Auf diese Weise konnte die Kolo­kalisierung von TO- und CB-Emissionssignalen für eine stringente Kontrolle der Spezifität bezüglich der mRNA-Zielerkennung dienen. Die Sequenz der **FIT-DNA3** war gegen den Poly-A-Schwanz der mRNA gerichtet und sollte somit ein unabhängiges Fluoreszenzmuster ergeben. Die *in vitro* Fluoreszenzmessung der **FIT-DNA3** zeigte einen 5-fachen Fluoreszenzanstieg nach der Zugabe von 5 Äq. RNA-Zielsequenz, weshalb eine Sondenkonzentration von 4 µM notwendig war. Der geringe Fluoreszenzanstieg sollte dennoch bei der hohen Menge an Zielsequenz zur Signalgebung ausreichen. Die Zugabe der **FIT-DNA1** und **FIT-DNA2** erfolgte in einer 2 µM und 1 µM Konzentration. Die Sequenzen und Fluoreszenzspektren aller verwendeten Sonden sind nochmals in Abbildung 4.1.9 A zusammengefasst. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der mit SLO permeabilisierten und anschließend stimulierten Zellen zeigte klare Emissionssignale in drei verschiedenen Fluoreszenzkanälen (Abbildung 4.1.9 B). Zur besseren Darstellung der Kolo­kalisierung diente ein Linienscan der Fluoreszenzemissionen (Abbildung 4.1.9 C). Das von der **FIT-DNA2** erzeugte Profil entsprach dem der **FIT-DNA1**. Der starke Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz ließ sich durch die höhere Responsivität der **FIT-DNA2** erklären. Der Linienscan der **FIT-DNA3** überlappte bereichsweise mit dem Linienscan der anderen beiden Fluoreszenzkanäle. Hier war zusätzlich ein diffuses Signal außerhalb des Zellkerns zu erkennen. Anhand dessen konnte die Funktionalität und die Spezifität der drei FIT-Sonden gegenüber der jeweiligen Zielsequenz in lebenden *Flp-In*<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>-Zellen demonstriert werden. Der simultane Einsatz mehrerer FIT-Sonden schien die Funktionalität dieser nicht zu beeinflussen.



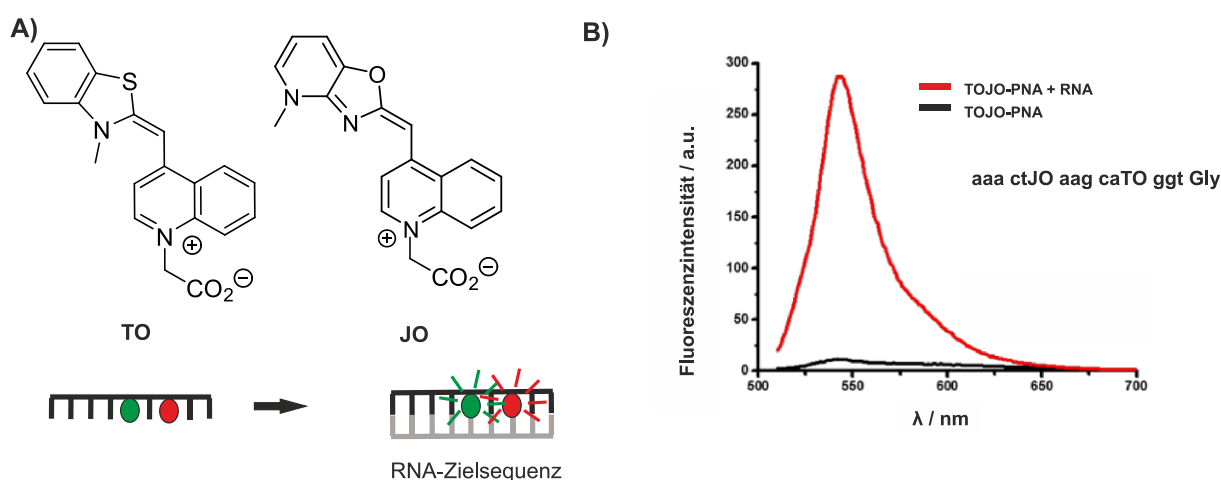
#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen



**Abbildung 4.1.9** A) Sequenzen der für die Mehrfarben-Lebendzell-Bildgebung verwendeten Sonden als auch die Zielsequenzen. B) Lebendzell-Mikroskopiebilder der *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen nach SLO-Permeabilisierung mit den drei FIT-Sonden. Zu sehen ist die Fluoreszenzemission der jeweiligen Sonde in separaten Kanälen, aufgenommen an einem 60 x Ölobjektiv. C) Normalisierte Fluoreszenzintensität der drei verschiedenen Sonden entlang der weißen Linie. d = Distanz; Grün = TO-Emission; Rot = CB-Emission; Blau = BO-Emission. Filter: BO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 438/24 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 483/32 nm; TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 545/40 nm; CB:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 575/25 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 628/40 nm.

#### 4.1.10 Fluoreszenzmikroskopie mit TO/JO-PNA-FIT-Sonden

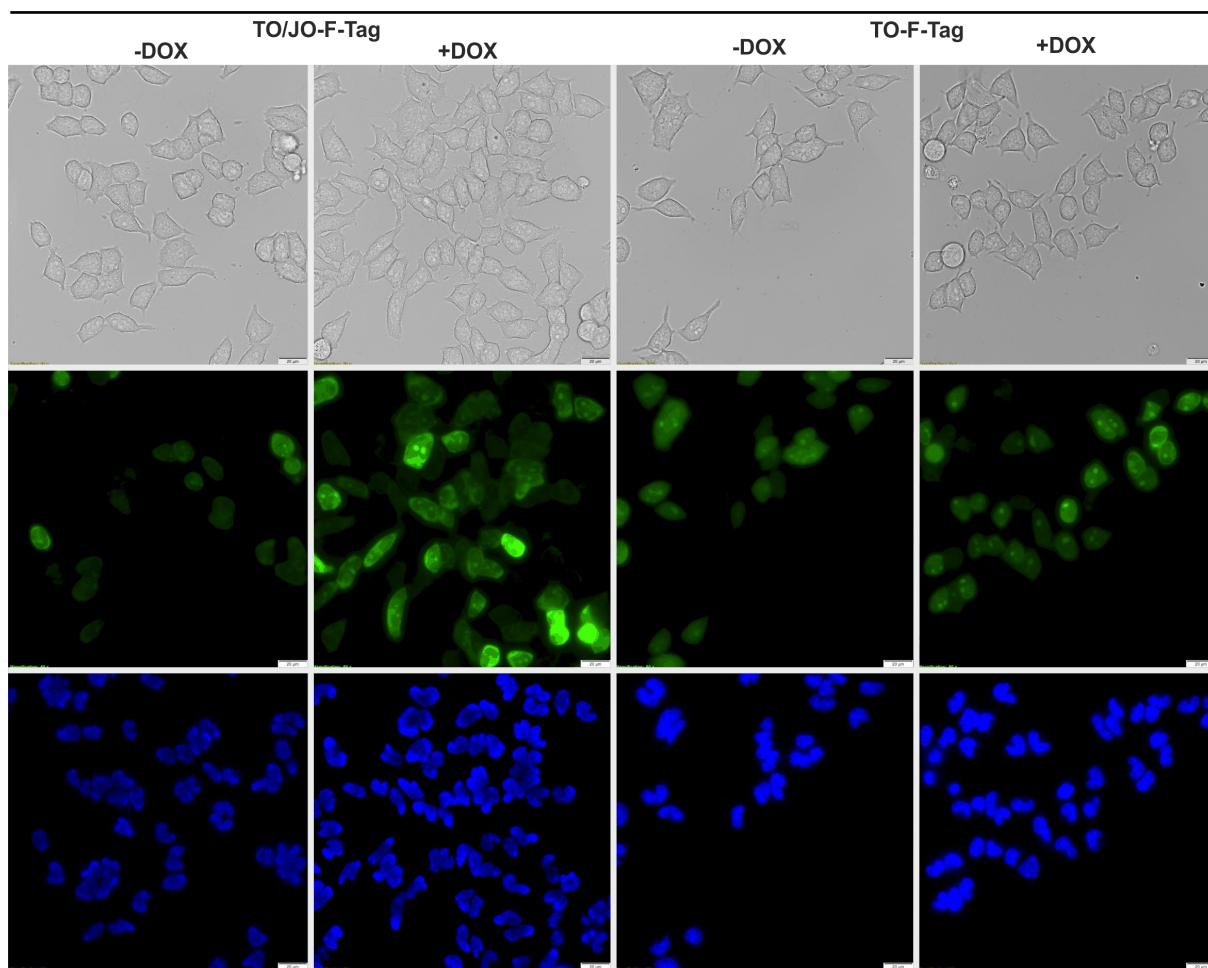
In einer weiteren Versuchsreihe wurde eine von Dr. Fang erstmals hergestellte TO/JO-F-Tag-PNA-Sonde mithilfe SLO-vermittelter Permeabilisierung in *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen eingebracht und anschließend am Mikroskop untersucht. TO/JO-Sonden zeichnen sich durch ihre hohe Responsivität und Helligkeit aus, wobei die geringe Fluoreszenz einzelsträngiger TO/JO-Sonden auf der Bildung von H-Aggregat-ähnlichen Farbstoff-Komplexen basiert. Im Doppelstrang ist der TO/JO-Kontakt hingegen unterbunden. Das TO dient hier als Lichtsammler und transferiert die Anregungsenergie auf den sehr hellen JO-Farbstoff.<sup>[53a]</sup>



**Abbildung 4.1.10.1** A) Strukturformeln von TO und JO sowie die schematische Darstellung der Funktionsweise einer TO/JO-Sonde. B) Emissionsspektrum einer TO/JO-Sonde vor und nach der Hybridisierung mit RNA-Zielsequenz.

Die Synthese TO/JO-markierter PNA-Sonden fand analog zu den von Dr. Hövelmann etablierten TO/JO-DNA-Sonden statt.<sup>[107]</sup> Als Zielsequenz diente die F-Tag-RNA-Sequenz (5' UAA UCA ACG GCC GGA CGU GCA U 3'). Die **TO/JO-F-Tag** (gtc-JO-gccg-TO-tgatta-Gly) wies mit einer Intensitätssteigerung von  $I/I_0 = 12$  gute Eigenschaften für die Zellexperimente auf. Für den besseren Vergleich der TO- und TO/JO-Fluoreszenzeigenschaften wurde eine identische PNA-Sonde ohne JO-Farbstoff hergestellt. Die baugleiche **TO-F-Tag** (gtccggccg-TO-tgatta-Gly) zeigte lediglich einen Fluoreszenzanstieg von  $I/I_0 = 4$ . Der Vergleich der **TO/JO-F-Tag** und der **TO-F-Tag** am Fluoreszenzmikroskop ergab deutliche Unterschiede in der Responsivität. Während die **TO-F-Tag** kaum einen Unterschied zwischen den Zellen mit und ohne mRNA-Zielsequenz aufwies, konnte ein eindeutiger Unterschied bei der Anwendung der **TO/JO-F-Tag** beobachtet werden (Abbildung 4.1.10.2). Darüber hinaus bedingte der Einsatz der **TO/JO-F-Tag** geringere Belichtungszeiten für die Aufnahme der Fluoreszenzbilder.

#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

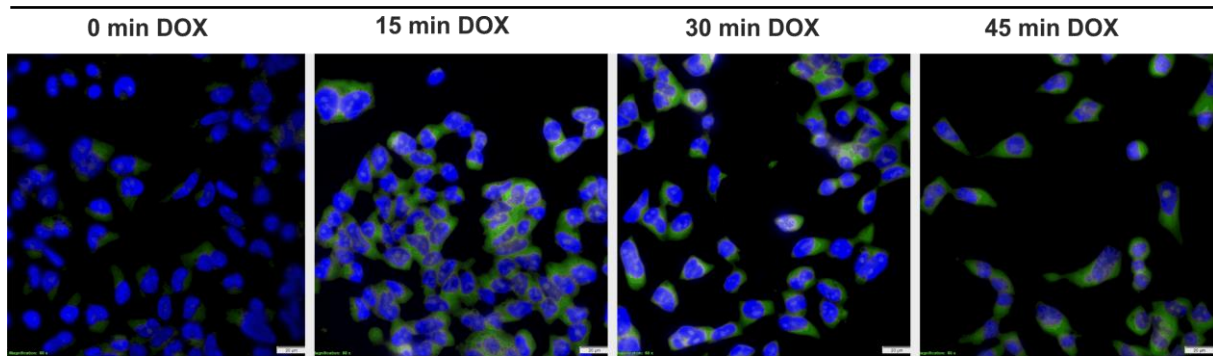


**Abbildung 4.1.10.2** Lebendzell-Fluoreszenzbilder von *Flp-In™ 293 T-REx™*-Zellen nach Inkubation mit **TO/JO-F-Tag** oder **TO-F-Tag** und 30 U SLO. -DOX = ohne Zugabe von Doxycyclin, +DOX = Zugabe von 2 µg/ml Doxycyclin für 1 h. Aufgenommen an einem 60 x Ölobjektiv. Grün = TO-Emission, Blau = Hoechst 33342. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ ; Hoechst 33342:  $\lambda_{\text{ex}} = 438/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 483/32 \text{ nm}$ . Die Skala beträgt 20 µm.

Die ROI-Analyse ergab mit der **TO-F-Tag** eine Steigerung der Emission um 130% und mit der **TO/JO-F-Tag** eine Steigerung um 320%. Da die Eigenschaften der **TO/JO-F-Tag** positiv für die Anwendung in Zellen erschienen, sollte zusätzlich die Kompatibilität der Sonde für die FISH-Anwendung überprüft werden. Es diente eine Zeitreihe der mRNA-Transkription nach der Zugabe von Doxycyclin. Die Zellen wurden nach der jeweiligen Stimulationsdauer durch Zugabe von 4% *p*-Formaldehyd fixiert, mit der FIT-Sonde durch FISH angefärbt und das Deckglas mit *Mounting Medium + DAPI* befestigt. Abbildung 4.1.10.3 zeigt die überlagerten Mikroskopiebilder der TO/JO- und DAPI-Emission nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Inkubation.



#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen



**Abbildung 4.1.10.3** Überlagerte Fluoreszenzbilder der TO- und Hoechst 33342-Emission, gemessen an einem 60 x Ölobjectiv. Dargestellt sind die Fluoreszenzbilder der Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit 2  $\mu\text{g/ml}$  Doxycyclin und anschließender Markierung durch FISH. Die Belichtungszeit betrug 6.99 ms. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ ; Hoechst 33342:  $\lambda_{\text{ex}} = 438/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 483/32 \text{ nm}$ . Die Skala beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

Zu Beginn der Versuchsreihe war kaum Fluoreszenzsignal der FIT-Sonden ersichtlich (0 min DOX). Das geringe Signal konnte, wie in der Echtzeit-PCR nachgewiesen, auf die geringe Menge an mRNA-Zielsequenz im unbehandelten Zustand der Zellen zurückgeführt werden. Nach längeren Inkubationszeiten stieg die Intensität des Fluoreszenzsignals gleichmäßig an. Für die Fluoreszenzaufnahmen waren lediglich Belichtungszeiten von nur 6.99 ms notwendig. Die hier resultierende kurze Belichtungszeit könnte bei Problemen, wie z.B. der Photobleichung, helfen und macht die TO/JO-PNA-Sonden dadurch zu vielversprechenden Werkzeugen in zukünftigen zellulären Experimenten.

---

### 4.1.11 Diskussion

In diesem Kapitel wurden unterschiedliche Arten der Transfektion von DNA- sowie PNA-basierten FIT-Sonden an lebenden *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen untersucht. Die vielversprechendsten Ergebnisse lieferte das Streptolysin-O. Das porenbildende Enzym geht keine Interaktionen mit den FIT-Sonden ein und bedingt dementsprechend auch keine falsch-positiven-Signale innerhalb der Zellen. Die mit SLO und FIT-Sonden transfizierten Zellen zeigten eine bis zu 450%-ige Intensitätssteigerung der Fluoreszenz bei Vorhandensein der Zielsequenz. Die Verwendung von SLO ist gleichermaßen für DNA als auch PNA geeignet. Die DNA-FIT-Sonden zeigten hierbei eine verbesserte Responsivität sowie Löslichkeit im Vergleich zu den PNA-FIT-Sonden. Für eine erfolgreiche Bildgebung reichten bereits Konzentration von 600 nM PNA oder 1 µM DNA, mit einer Inkubationszeit von nur 10 min. Dies ermöglicht die Durchführung mehrerer Transfektionen innerhalb eines kurzen Zeitraumes. Es konnten drei unterschiedlich markierte FIT-Sonden (**FIT-DNA1**, **FIT-DNA2** und **FIT-DNA3**) in der Mehrfarben-Bildgebung eingesetzt werden. Ein großer Vorteil des SLO liegt dabei in der hohen Transfektionseffizienz, geringen Zytotoxizität, homogenen Verteilung und hohen Responsivität der Sonden. Ein Vergleich mit den Transfektionsexperimenten der *molecular beacons* (MBs), zeigte Parallelen im Verhalten beider Sonden auf. So konnten durch den Einsatz von SLO bereits MBs in unterschiedliche Zelllinien eingebracht werden.<sup>[41b, 60, 108]</sup> Die Mikroinjektion und Elektroporation stellten zwei weitere Methoden dar, die bereits mit MBs und FIT-Sonden erfolgreich verwendet wurden.<sup>[3, 109]</sup> Die Elektroporation schien jedoch für genetisch veränderte, adhärenzte Zellen ungeeignet. Es konnte zwar ein Intensitätsanstieg in den stimulierten Zellen beobachtet werden, jedoch traten wiederholt fluoreszente Aggregate der Sonden und eine veränderte Morphologie der Zellen auf. Die Verwendung von zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) und Lipofektion resultierte bei den FIT-Sonden ebenfalls vermehrt in fluoreszenten Aggregaten im Zytosol. Die MBs konnten dagegen erfolgreich durch CPPs, wie z.B. das TAT-Peptid, in BGMK-Zellen eingeführt werden.<sup>[110]</sup> Hier wäre die Untersuchung weiterer Zelllinien und CPPs mit den FIT-Sonden denkbar (siehe Kapitel 4.3.2.2).

Obwohl die MBs bereits mehrfach erfolgreich in lebende Zellen eingebracht wurden, konnte bislang keine Dreifarben-Lebendzell-Bildgebung, wie mit den FIT-Sonden, durchgeführt werden.<sup>[41b, 48, 109c, 110]</sup> Die Optimierung des Strukturaufbaus stellt in Form der Sequenz, des Schmelzverhaltens der Stammstruktur und des resultierenden Fluoreszenzanstiegs nach Hybridisierung eine große Herausforderungen dar. Beim Design der FIT-Sonden muss lediglich die Position des Farbstoffes in der Sequenz ermittelt werden. Die unkomplizierte Verwendung von

#### 4.1 Untersuchung der Aufnahme von FIT-Sonden in lebende Zellen

---

SLO sollte zudem zur vermehrten Anwendung in den Mehrfarben-Lebendzell-Experimenten motivieren und den parallelen Einsatz von mehr als drei FIT-Sonden ermöglichen.

---

### 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

T-Zellen bzw. T-Lymphozyten bilden eine Gruppe der weißen Blutzellen, die der Immunabwehr im Körper dienen. Einige T-Zellen haben die Fähigkeit Krebszellen zu erkennen und damit deren Bekämpfung einzuleiten. Häufig sind diese krebsspezifischen T-Zellen jedoch nicht im ausreichenden Maße im Blut vorhanden und entwickeln zudem im Laufe der Zeit eine Tarnung (*immun editing*).<sup>[111]</sup> 2010 konnten erste therapeutische Erfolge unter Anwendung gentechnologisch veränderter T-Zellen, der so genannten CAR-T-Zellen (*chimeric antigen receptor*), verzeichnet werden.<sup>[112]</sup> Bei dieser Therapie werden körpereigene T-Zellen *ex vivo* mit einem CAR ausgestattet, der sich aus einer extrazellulären Bindedomäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Signalsequenz zusammen setzt. Die Bindedomäne, ein Antikörperfragment, ist für die Erkennung der Tumorzellen verantwortlich. Die Transmembrandomäne sorgt für eine Verankerung des CAR auf der Oberfläche der T-Zellen. Gegenwärtig werden verschiedenste Signalsequenzen in klinischen Studien untersucht.<sup>[113]</sup> Der Einbau des CAR findet dabei meist mithilfe viraler Gentransfervektoren statt, was zu einer stabilen Insertion in das Genom der T-Zellen führt. So wird auch bei der Aktivierung und Teilung der T-Zellen, die genetische Information weitergegeben. Allerdings führt die Therapie mit den CAR-T-Zellen auch zu Nebenwirkungen. Das Immunsystem reagiert oft mit einer Entzündung im ganzen Körper, der sogenannten Hyperzytokinämie. Ebenfalls konnte das CAR-Molekül bei den meisten bisherigen Studien nicht zwischen Krebszellen und B-Lymphozyten unterscheiden. Dies bedingte eine Schwächung des Immunsystems.<sup>[113a, 114]</sup> Idealerweise könnten körpereigene, krebsspezifische, zytotoxische T-Zellen aus dem Blut isoliert, *ex vivo* kultiviert und anschließend wieder dem Patienten, zur Verstärkung der eigenen Abwehrkräfte, verabreicht werden. Da es sich um körpereigene Zellen handelt sollten starke Nebenwirkungen ausbleiben. Für diese Therapiemethode sollte im weiteren Verlauf das geeignete Werkzeug zur Erkennung und Isolation dieser Zellen ermittelt werden. Die Markierung der spezifischen T-Zellen sollte mithilfe der selektiven Anfärbung durch die Hybridisierung mit FIT-Sonden erfolgen. Als aussichtsreich erschien es, die FIT-Sonden gegen die CDR3-Region (*complementarity determining region*) der TCR-mRNA zu richten, da diese die Antigenspezifität der T-Zelle bestimmt.

### 4.2.1 Sequenzierung der CDR3-Region der TCR-mRNA

*HS Diagnostica* zeigte durch die Sequenzierung des Genoms dreier verschiedener T-Zelllinien (Jurkat, Molt-16 und CCRF-CEM) einen spezifischen und einmaligen Bereich in der jeweiligen CDR3-Region der TCR-mRNA. Diese sind in Abbildung 4.2.1 gelb markiert. Die Überprüfung der Basenabfolge der Sequenzen erfolgte mittels BLAST. Die Hybridisierung der Sonden in dem jeweiligen spezifischen Bereich müsste demzufolge in einer erhöhten TO-Emission resultieren. Zur Überprüfung des Konzeptes galt es zunächst die nukleaseresistenten FIT-Sonden herzustellen und diese anschließend an lebenden T-Zellen zu untersuchen.

CCRF-CEM

TCTCACCTAAATCTCCAGACAAAGCTCACTTAAATCTTCACATCAATCCCTGGAGCTTGGTGACTCTGCTGTGTATTTCTGT  
GCCAGCAGCCTTGGGACAGATACGCAGTATTTTGGCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTT  
CCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACAC

Jurkat

TGAAGATCCAGCCCTCAGAACCCAGGGACTCAGCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTTTCTCGACCTGTTCCGGCTAACTATG  
GCTACACCTTCGGTTCGGGGACCAGGTTAACCGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTT  
GAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACAC

MOLT-16

TCAACCATGCAAGCCTGACCTTGTCCTCTGACAGTGACCAGTGCCCATCCTGAAGACAGCAGCTTCTACATCTGCAGTG  
CAGGGGAGTCGGGGGGCGTAACAGATACGCAGTATTTTGGCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAA  
CGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACAC

Forward primer

CDR3 Region

Reverse Primer binding site

**Abbildung 4.2.1** Die spezifischen CDR3-Regionen (gelb) der TCR-mRNA der jeweiligen Zelllinie mit *forward*-Primerbindungsstelle (grün) und *reversed*-Primerbindungsstelle (rot). Ermittelt wurde die Sequenz über BLAST.

### 4.2.2 Synthese nukleaseresistenter Sonden

Die DNA-basierten TO-FIT-Sonden sollten eine Länge von 20 Nukleotiden erfassen. Dadurch sollte die nötige Selektivität in der Sequenz gewährleistet und die unspezifische Bindung mit zellulärer RNA vermieden werden. Die CDR3-Region bot mit 30 - 42 Nukleotiden jedoch keine große Variabilität in der Lage der 20 Nukleotid langen Sonde. Zudem gleichen sich die mRNA-Regionen

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

bereichsweise in der Sequenzabfolge. So sind die ersten acht Nukleotide der CCRF-CEM- und Jurkat-Sequenz identisch. Eine TO-Positionsrastrung von jeweils drei Positionen pro CDR3-Bereich diente zur Ermittlung der optimalen Umgebung des Farbstoffes. Nach Erfahrungen in der Arbeitsgruppe Seitz sollte der Farbstoff optimalerweise zwischen einer Purinbase und einer Pyrimidinbasen positioniert werden.<sup>[53a]</sup> Dies wurde jedoch durch den hohen GC-Gehalt von > 50% erschwert. Nach der Synthese und Ermittlung der Fluoreszenzeigenschaften der DNA-Sonden (**x-Test-y**) folgte die Herstellung der geeignetsten Sequenzen, als nukleaseresistente Mixmer-Sonden (**x-L**). Die Fluoreszenzeigenschaften im Einzel- und Doppelstrang sowie die Helligkeiten sind in Tabelle 4.2.2.1 aufgelistet.

**Tabelle 4.2.2.1** TO-markierte FIT-Sonden, komplementär zur spezifischen CDR3-Region der TCR-mRNA.

| Sonde                  | Sequenz                            | I <sub>0</sub> | I    | I/I <sub>0</sub> | Br <sub>ds</sub> |
|------------------------|------------------------------------|----------------|------|------------------|------------------|
| <b>CCRF-CEM-Test-a</b> | TCTGTCCAAGGXT <sub>L</sub> GCTGGC  | 22             | 184  | 8.4              | 14               |
| <b>CCRF-CEM-1-L</b>    | UCUGUCCCAAGGXT <sub>L</sub> GCUGGC | 40             | 164  | 4.1              | 9.6              |
| <b>CCRF-CEM-Test-b</b> | ATCTGTCCCAXG <sub>L</sub> GCTGCTGG | 14             | 34.4 | 2.5              | 2.6              |
| <b>CCRF-CEM-Test-c</b> | TCTGTCCAAGGCTGXT <sub>L</sub> GGC  | 16             | 165  | 10               | 10               |
| <b>CCRF-CEM-2-L</b>    | UCUGUCCCAAGGCUGXT <sub>L</sub> GGC | 40             | 152  | 3.7              | 13               |
| <b>Molt-16-Test-a</b>  | TGCGTATCTGXT <sub>L</sub> ACGCCCCC | 24             | 117  | 4.9              | 8.5              |
| <b>Molt-16-1-L</b>     | UGCGUAUCUGXT <sub>L</sub> ACGCCCCC | 126            | 166  | 1.3              | 12               |
| <b>Molt-16-Test-b</b>  | ACGCCCCCGXC <sub>L</sub> TCCCTGC   | 77             | 146  | 1.8              | 11               |
| <b>Molt-16-Test-c</b>  | ATACTGCXT <sub>L</sub> ATCTGTTACGC | 52             | 80   | 1.5              | 6.8              |
| <b>Jurkat-Test-a</b>   | TAGCCATAGXT <sub>L</sub> AGCCGAACA | 70             | 252  | 3.6              | 17               |
| <b>Jurkat-Test-b</b>   | AGCCGAACAGXT <sub>L</sub> CGAGAAAC | 18             | 166  | 9.1              | 13               |
| <b>Jurkat-1-L</b>      | AGCCGAACAGXT <sub>L</sub> CGAGAAAC | 16             | 151  | 9.3              | 16               |
| <b>Jurkat-Test-c</b>   | GGTGTAGCCXT <sub>L</sub> AGTTAGCCG | 21             | 119  | 5.7              | 7.7              |
| <b>Jurkat-2-L</b>      | GGUGUAGCCXT <sub>L</sub> AGUUAGCCG | 44             | 110  | 2.5              | 7.8              |

X= TO-Monomer, unterstrichene Buchstaben zeigen 2'-O-Me-Bausteine, tiefgestelltes „L“ zeigt LNA-Baustein. Bedingungen: 0.5 µM Sonde und 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7) bei 37 °C. λ<sub>ex</sub> = 485 nm, λ<sub>em</sub> = 535 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

Bei genauerer Betrachtung der Fluoreszenzwerte fiel auf, dass die Integration von 2'-OMe-Nukleotiden in die Sequenz mit einer Abnahme der Responsivität einherging. Ähnliche Effekte wurden bereits in vorherigen Arbeiten beschrieben.<sup>[53a]</sup> Die 2'-OMe-Bausteine führten hier zu einer erhöhten TO-Emission im Einzelstrang, was eine Erniedrigung der Responsivität zur Folge hatte. Die erhöhte Helligkeit der **CCRF-CEM-2-L**, im Gegensatz zur **CCRF-CEM-1-L**, könnte die spätere Detektion der Fluoreszenz erleichtern. Die **Molt-16-1-L** besaß ebenfalls eine geringere Responsivität als die reine DNA-Sonde. Ausschließlich die **Jurkat-1-L** zeigte gleichbleibende Eigenschaften.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

Die Sequenz wies jedoch auch die geringste Anzahl an GC-Basen ( $GC < 10$  Nukleotide) auf. Auf Grundlage der unterschiedlichen Eigenschaften von DNA- und Mixmer-FIT-Sonden wurde in den nachfolgenden Schritten auf die Positionsrastrung, anhand DNA-basierter Sonden, verzichtet und direkt auf die Herstellung nukleaseresistenter Sonden umgestellt. Es lagen somit jeweils fünf Mixmer-Sonden pro CDR3-Region vor. In Tabelle 4.2.2.2 sind die Sequenzen mit den jeweiligen Fluoreszenzintensitäten sowie die Fluoreszenzsteigerungen und Helligkeiten dargestellt.

**Tabelle 4.2.2.2** Nukleaseresistente TO-FIT-Sonden komplementär zur CDR3-Region der TCR-mRNA.

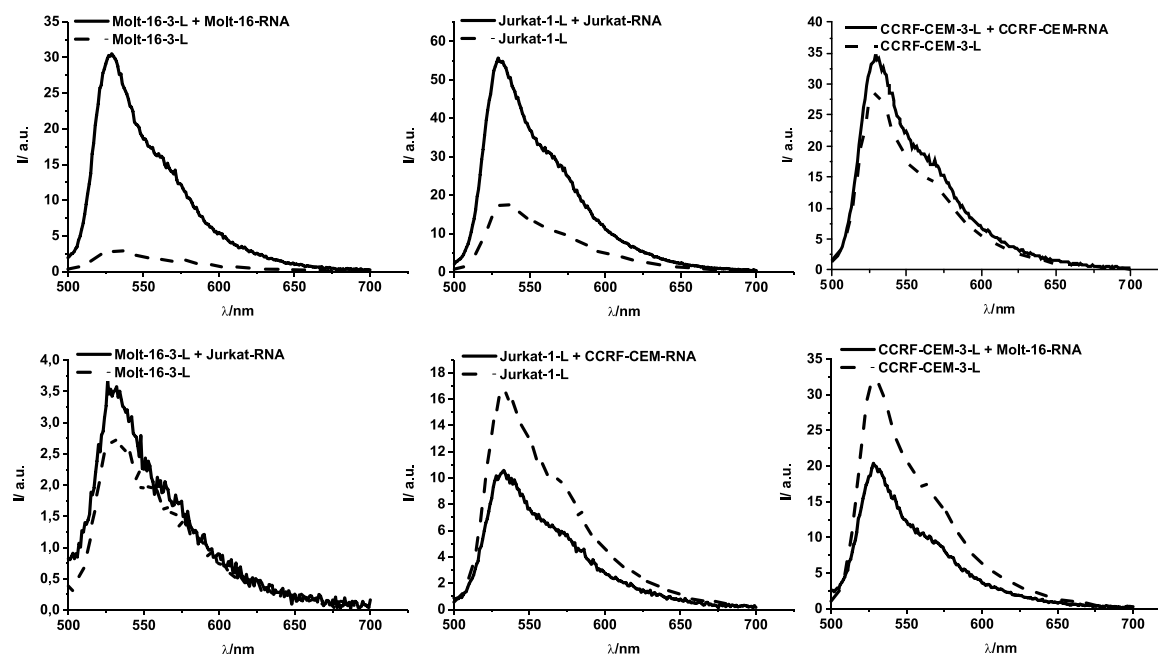
| Sonde               | Sequenz   | $I_0$ | $I$ | $I/I_0$ | Br ds |
|---------------------|---|-------|-----|---------|-------|
| <b>CCRF-CEM-1-L</b> | <u>UCUGUCCCAAGGXT<sub>L</sub>GCUGGC</u>             | 40    | 164 | 4.1     | 9.6   |
| <b>CCRF-CEM-2-L</b> | <u>UCUGUCCCAAGGCU<sub>L</sub>GXT<sub>L</sub>GGC</u> | 40    | 152 | 3.7     | 13    |
| <b>CCRF-CEM-3-L</b> | <u>UCTXT<sub>L</sub>CCCAAGGCU<sub>L</sub>GCUGGC</u> | 12    | 137 | 11      | 6.9   |
| <b>CCRF-CEM-4-L</b> | <u>UCUGUCCX<sub>L</sub>AGGCU<sub>L</sub>GCUGGC</u>  | 18    | 34  | 1.8     | 2     |
| <b>CCRF-CEM-5-L</b> | <u>UCUGUCCCAAGGCT<sub>L</sub>XCUGGC</u>             | 31    | 112 | 3.6     | 6.5   |
| <b>Molt-16-1-L</b>  | <u>UGCGUAUCUGXT<sub>L</sub>ACGCCCC</u>              | 126   | 166 | 1.3     | 12    |
| <b>Molt-16-2-L</b>  | <u>UGCGUAUCTG<sub>L</sub>XTACGCCCC</u>              | 85    | 121 | 1.4     | 9     |
| <b>Molt-16-3-L</b>  | <u>ACGCCCCCGA<sub>L</sub>XTCCCCUGC</u>              | 5.8   | 154 | 26      | 17    |
| <b>Molt-16-4-L</b>  | <u>AUACUGCGUATXT<sub>L</sub>GUUACGC</u>             | 12    | 118 | 9.8     | 9     |
| <b>Molt-16-5-L</b>  | <u>AUAXT<sub>L</sub>GCGUAUCUGUUACGC</u>             | 10    | 41  | 4.1     | 3     |
| <b>Jurkat-1-L</b>   | <u>AGCCGAACAGXT<sub>L</sub>CGAGAAAC</u>             | 16    | 151 | 9.3     | 16    |
| <b>Jurkat-2-L</b>   | <u>GGUGUAGCCXT<sub>L</sub>AGUUAGCCG</u>             | 44    | 110 | 2.5     | 7.8   |
| <b>Jurkat-3-L</b>   | <u>GGUGUAGCCAUAXT<sub>L</sub>TAGCCG</u>             | 15    | 158 | 10.5    | 10    |
| <b>Jurkat-4-L</b>   | <u>GGTXT<sub>L</sub>AGCCAUAGUUAGCCG</u>             | 52    | 98  | 1.8     | 8     |
| <b>Jurkat-5-L</b>   | <u>GGUGT<sub>L</sub>XGCCAUAGUUAGCCG</u>             | 14    | 34  | 2.4     | 2     |

X= TO-Monomer, unterstrichene Buchstaben zeigen 2'-O-Me-Bausteine, tiefgestelltes „L“ zeigt LNA-Baustein. Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5  $\mu$ M RNA-Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37 °C.  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 535 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

Die **CCRF-CEM-3-L** verfügte mit  $I/I_0 = 11$  eine ausreichende Responsivität für die Anwendung in lebenden Zellen. **Molt-16-3-L** erreichte sogar einen 26-fachen Fluoreszenzanstieg nach der Hybridisierung mit der RNA-Zielsequenz. Die Jurkat-Sonden (**Jurkat-1-L** und **Jurkat-3-L**) zeigten sehr ähnliche Fluoreszenzeigenschaften, jedoch wurde die **Jurkat-1-L** auf Grund der höheren Helligkeit in den nachfolgenden Experimenten eingesetzt. Die ausgewählten Sonden wurden zunächst mit der komplementären volllängen RNA und einer nicht-komplementären volllängen RNA der CDR3-Region (isoliert in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frohme, TH Wildau) vermessen.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

Es wurde die Funktionalität der Sonden überprüft, sodass diese ausschließlich mit der jeweiligen komplementären volllängen RNA, unter Steigerung der Fluoreszenz, hybridisierten. Abbildung 4.2.2 zeigt die Fluoreszenzspektren vor und nach der Zugabe der RNA zu der jeweiligen FIT-Sonde.



**Abbildung 4.2.2** *In vitro* Messungen der FIT-Sonden mit komplementärer und nicht-komplementärer volllängen RNA. Bedingungen: 0.8  $\mu$ M Sonde und 0.5 Äq. RNA-Zielsequenz (0.2 Äq. RNA-Zielsequenz im Fall der CCRF-CEM-RNA) in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7) bei 37 °C in einer 120  $\mu$ l Küvette.  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 535 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

In allen drei Messungen ging die Zugabe der komplementären volllängen RNA mit einer Intensitätssteigerung der TO-Emission einher. Diese betrug mit der **Molt-16-3-L**  $I/I_0 = 12$ , mit der **Jurkat-1-L**  $I/I_0 = 3$  und mit der **CCRF-CEM-3-L**  $I/I_0 = 1.2$ . Der geringe Fluoreszenzanstieg im Fall der CCRF-CEM-RNA konnte auf die geringere Menge an isolierter RNA zurückgeführt werden. Hier wurden, trotz mehrfacher Isolation, nur 0.2 Äq RNA erhalten. Interessanterweise war bei der Zugabe der nicht-komplementären RNA kein Anstieg der Fluoreszenz, sondern ein Absinken dieser zu beobachten. Eine Ausnahme bildete die **Molt-16-3-L** mit der Jurkat-RNA. Hier lag die absolute Fluoreszenzintensität nach der Hybridisierung etwas erhöht vor, wobei sich diese weiterhin im Bereich des Rauschens befand.

Es konnte gezeigt werden, dass die Sonden in der Lage waren mit der mRNA der CDR3-Region, unter Steigerung der Fluoreszenz, zu hybridisieren. Da bei den nicht-komplementären RNA-Sequenzen kein bzw. ein sehr geringer Fluoreszenzanstieg beobachtet wurde, konnte eine Intensitätssteigerung durch eine fehlerhafte partielle Hybridisierung zunächst ausgeschlossen werden.



Die ausgewählten Sonden wurden anschließend in der Arbeitsgruppe Frohme mit einem Elektroporator in die verschiedenen Zelllinien eingeführt und die Fluoreszenzemission am FACS (*fluorescence activated cell sorter*) analysiert. Die ersten Messungen fanden aufgrund der leichteren Handhabbarkeit mit den Jurkat- und Molt-16-Zellen statt. Diese stellen im Gegensatz zu den CCRF-CEM-Zellen reine Suspensionszellen dar und benötigen somit keine vorherige Behandlung mit Trypsin. Die ersten Testergebnisse lieferten jedoch im Gegensatz zu den Experimenten in der Küvette uneindeutige Ergebnisse, deren Ursprung unklar war (Anhang, Abbildung 9.2.2.4).

Aus diesem Grund wurden die Zelllinien und der Elektroporator der Arbeitsgruppe Frohme ausgeliehen und die Arbeiten in den Laboratorien der Arbeitsgruppe Seitz fortgesetzt. Die Zellkultur und die Elektroporation wurden durch Dr. Christina Kuznia durchgeführt.

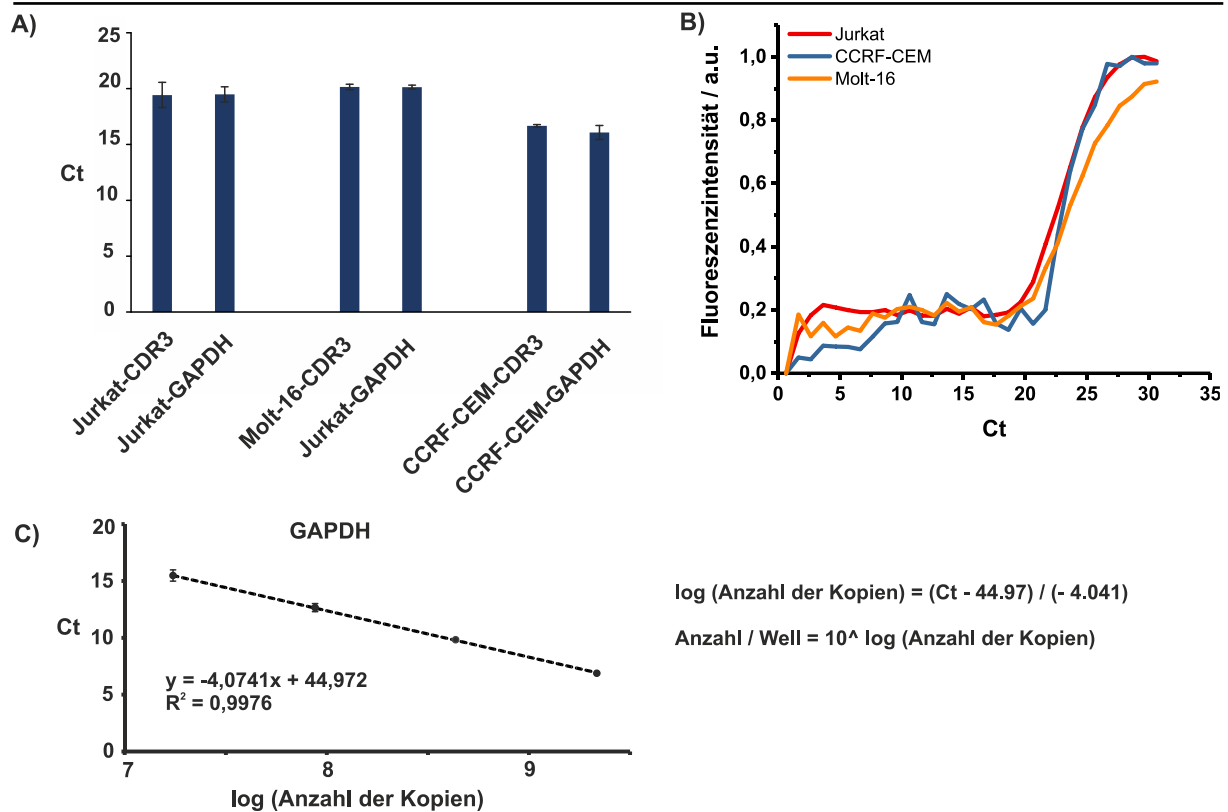
### 4.2.3 Quantifizierung der TCR-mRNA

Für eine erfolgreiche Durchführung der Experimente ist das Vorhandensein ausreichender Mengen an Zielsequenz erforderlich. Dementsprechend wurde zuvor das mRNA-Level der T-Zellen über eine Echtzeit-PCR ermittelt.

Die RNA der T-Zellen wurde aus jeweils drei unterschiedlichen Zellpopulationen mit einem *RNeasy Mini Kit* (50) isoliert. Im Anschluss wurde die Transkription der isolierten mRNA in cDNA und die quantitative Echtzeit-PCR mittels *fast SYBRGreen™* durchgeführt. Als Referenzgen diente das *housekeeping* Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Die Anzahl der Kopien der GAPDH-mRNA liegt laut Literatur durchschnittlich bei 1000 - 10000 Stück pro Zelle.<sup>[115]</sup>

Die Ergebnisse der Echtzeit-PCR sind in Abbildung 4.2.3 A dargestellt. Die Molt-16-mRNA erreichte mit einem Ct von 20 das geringste mRNA-Level, gefolgt von dem Ct-Wert der Jurkat-mRNA und der CCRF-CEM-mRNA. Alle Werte lagen jedoch in einem engen Bereich zueinander. Die Abweichungen könnten auf Konzentrationsschwankungen durch Pipettierfehler zurückgeführt werden. Entscheidend war die Übereinstimmung der Ct-Werte der CDR3- und GAPDH-Region. Demzufolge sollte in allen Zellen von einem ausreichenden Maß an Zielsequenz ausgegangen werden. Zusätzlich wurden die jeweiligen FIT-Sonden in der Echtzeit-PCR eingesetzt, um deren Einsatzbreite zu illustrieren. Abbildung 4.2.3 B zeigt die Amplifikationskurven, die unter Verwendung der FIT-Sonden erhalten wurden.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden



**Abbildung 4.2.3** PCR-Ergebnisse der isolierten mRNA der T-Zellen. A) Balkendiagramm der Ct-Werte der CDR3- und GAPDH-Region, angegeben als Mittelwert mit Standardabweichung. B) Amplifikationskurven der jeweiligen FIT-Sonden. C) Auftragung der Ct-Werte gegen log (Anzahl der Kopien) zur Bestimmung der RNA-Konzentration in den T-Zellen, durchgeführt mit SYBRGreen™.

Zur Quantifizierung der TCR-mRNA diente ein synthetisches Oligomer der GAPDH-Sequenz. Der anschließende Vergleich mit den bereits zuvor ermittelten Ct-Werten der CDR3- und GAPDH-Region (Abbildung 4.2.3 A) sollte einen Richtwert für das mRNA-Level in den Zellen geben. Die folgende Sequenz 5'CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG CAC CCC TGG CCA AGG TCA TCC ATG ACA ACT TTG GTA TCG TGG AAG GAC TCA TGA CCA CAG TCC ATG CCA T 3' wurde in verschiedenen Konzentrationen (0.1 ng/well, 0.02 ng/well, 0.004 ng/well und 0.0008 ng/well) mit den bereits zuvor verwendeten GAPDH-Primern vermessen. Über eine logarithmische Auftragung der Ct-Werte gegen die Anzahl der Kopien wurde die dazugehörige Steigung ermittelt (Abbildung 4.2.3 C). Anhand der angegebenen Formel konnte somit die Menge an GAPDH in der jeweiligen T-Zelllinie berechnet werden. Mit einer Menge von 2000 - 7000 mRNA-Kopien pro Zelle lag dieser in der Größenordnung der Literaturangaben.<sup>[115a]</sup> Da die Ct-Werte der GAPDH- sowie CDR3-Region nahezu identisch waren, konnte jeweils von der gleichen Menge an TCR-mRNA ausgegangen werden. Die mRNA stellte somit ein ausreichendes Level für die mRNA-Visualisierung durch FIT-Sonden in lebenden Zellen dar.

---

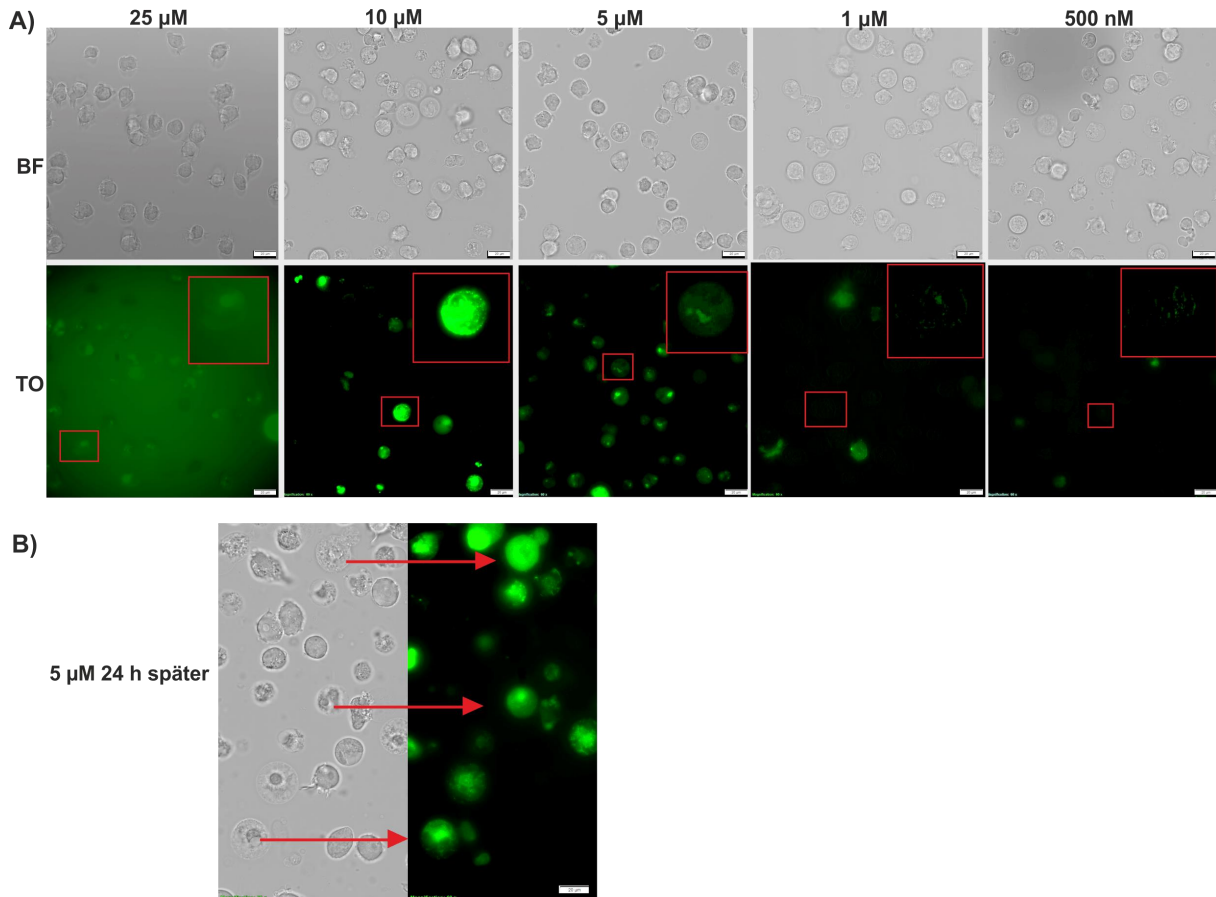
### 4.2.4 Optimierung der Versuchsbedingungen

Eine optimale Sondenkonzentration ist entscheidend für ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis und demzufolge für eine erfolgreiche Markierung der Zellen. Das Einbringen einer zu hohen Sondenkonzentrationen kann zu falsch-positiven Fluoreszenzsignalen durch die Anreicherung ungebundener Sonde führen. Durch eine zu geringe Konzentration kann hingegen eine nicht unvollständig gebundene mRNA-Zielsequenz resultieren und demzufolge eine geringe Fluoreszenzintensität bewirken. Ebenfalls ist der Zustand der Zellen nach der Elektroporation für den Erfolg der Experimente entscheidend, da diese im Idealfall eine Sortierung und anschließende Zellkultur unbeschadet überstehen sollten. Eine beschädigte Zellmembran kann nachträglich überschüssige Sonde aus der Elektroporationslösung aufnehmen und somit für ein falsch-positives Signal sorgen. Da in der AG Frohme die FACS-Experimente unter Anwendung von nur einer Elektroporatoreinstellung und zweier Konzentrationen (5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) stattfanden, sollten anschließend die Elektroporationsbedingungen für jede Zelllinie einzeln untersucht und optimiert werden.

Es folgte zunächst die Untersuchung der Sondenkonzentration. Während der Optimierung wurden die Jurkat-Zellen mit einer Sonde geringer Fluoreszenzintensität (**Molt-16-3-L**) bei 1400 V, 20 ms und 1 Puls (Bedingung c) elektroporiert. Durch eine erhöhte TO-Emission, bedingt durch das Vorhandensein der komplementären Zielsequenz, müsste bei der verwendeten Konzentration die Fluoreszenz einer Jurkat-Sonde ebenfalls detektierbar sein. Die Aufnahmen der Fluoreszenz erfolgten nach 10 min und 24 h. In Abbildung 4.2.4.1 A sind die Fluoreszenzbilder der Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Sonde dargestellt. Bei einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  konnte eine starke TO-Emission im Medium beobachtet werden. Obwohl die Zellen nach der Elektroporation abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert wurden, konnte das vorherige Medium nicht vollständig abgenommen werden, weshalb ein Teil der Sonden darin zurückblieb (Abbildung 4.2.4.1 A, 25  $\mu\text{M}$ ). Bei der Verwendung von 10  $\mu\text{M}$  Sonde war ein deutlicher Kontrast zwischen Hintergrund und Zellen erkennbar, jedoch schien die Menge an Sonde, durch die übersättigte Emission in den Zellen, zu hoch. Eine ausreichende Fluoreszenz sowie unveränderte Zellmorphologie resultierte bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ . Die Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  und 500 nM Sonde reichten ebenfalls zu Analyse einiger weniger Zellen aus. Durch das geringere Fluoreszenzsignal in der Mehrheit der Zellen war jedoch eine umfangreichere Bildbearbeitung notwendig. Für den Vergleich der Fluoreszenzintensität musste zudem sichergestellt werden, dass die analysierten Zellen auch wirklich Sonde enthielten.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

Dementsprechend wurden die nachfolgenden Zellexperimente mit 5  $\mu\text{M}$  Sonde durchgeführt, um ein ausreichendes Signal sicherzustellen. Die vollständigen Aufnahmen am 10 x Objektiv sind im Anhang, Abbildung 9.2.4.1 dargestellt.

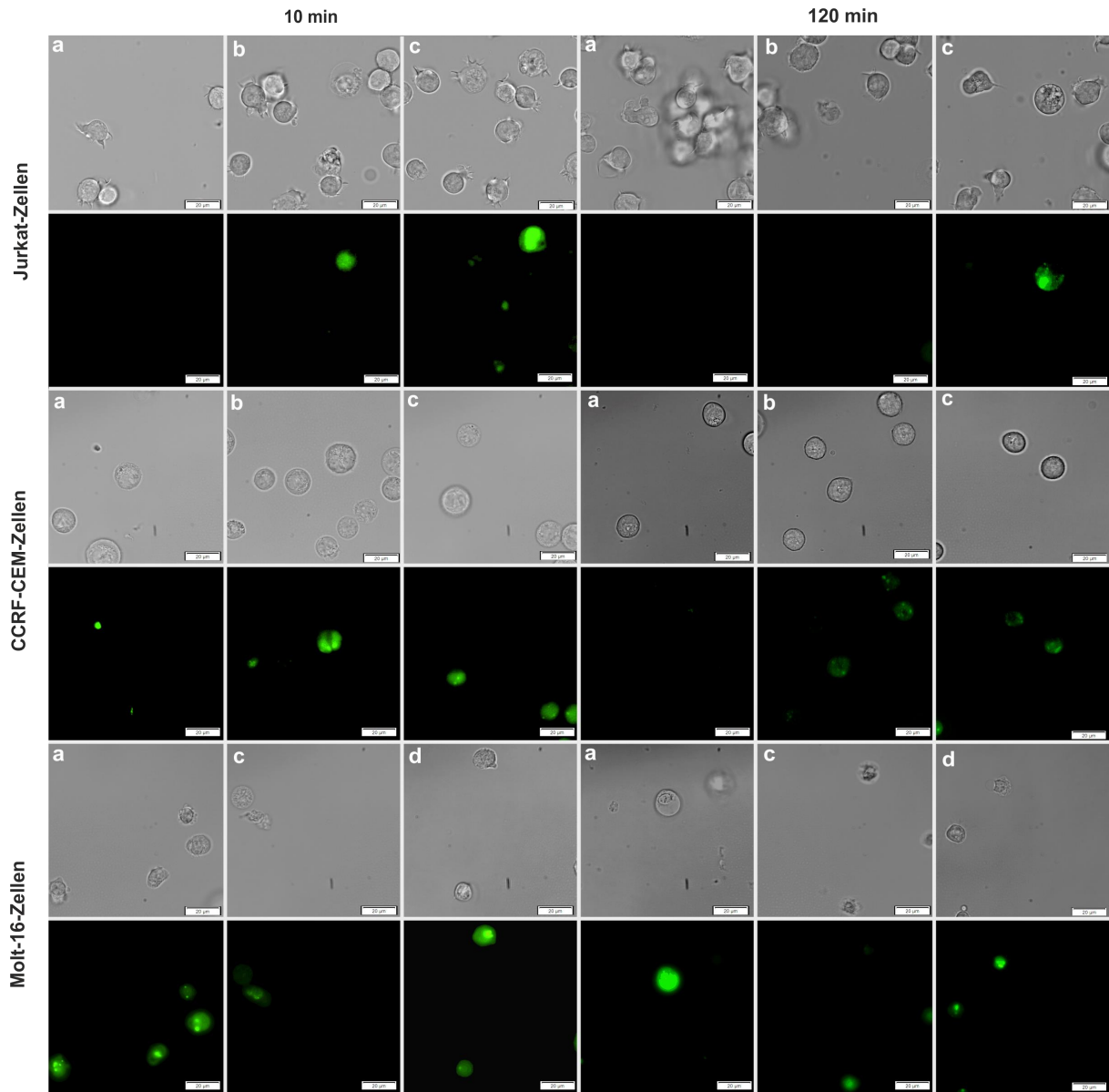


**Abbildung 4.2.4.1** A) Hellfeld- und Fluoreszenzbilder der Jurkat-Zellen mit **Molt-16-3-L**, gemessen an einem 60 x Objektiv in RPMI. Aufgenommen 10 min nach Elektroporation mit verschiedenen Konzentrationen an Sonde. B) Aufnahmen der Molt-16-Zellen 24 h nach der Elektroporation mit 5  $\mu\text{M}$  **Jurkat-1-L**-Sonde unter denselben Elektroporationsbedingungen, gemessen an einem 60 x Öljektiv in RPMI. Der Pfeil markiert die toten bzw. beschädigten Zellen. Der Kontrast wurde bei allen Bildern gleichermaßen bearbeitet, um die transfizierten Zellen kenntlich zu machen. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40$  nm. Die Skala beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

Da die Molt-16-Zellen unter diesen Elektroporationsbedingungen starke Schäden der Zellmembran bzw. ihrer Morphologie aufzeigten (Abbildung 4.2.4.1 B), mussten die Bedingungen ebenfalls angepasst werden. Dafür wurde die Morphologie als auch die Fluoreszenzintensität aller Zellen unter verschiedenen Bedingungen nach 10 min und 120 min am Mikroskop analysiert. Als Starteinstellung diente die bereits in der Arbeitsgruppe Frohme verwendete Bedingung c. Zusätzlich zu dieser sollten abgeänderte Einstellungen am *Neon*<sup>TM</sup> Elektroporator getestet werden. Beginnend mit den Jurkat-Zellen wurden Bedingung a (1325 V, 10 ms, 1 Puls), Bedingung b (1325 V, 10 ms, 3 Pulse) und Bedingung c (1400 V, 20 ms, 1 Puls) angewandt. Die dazugehörigen Fluoreszenzbilder liegen in Abbildung 4.2.4.2 vor.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

- a) 1325 V, 10 ms, 1 Puls
- b) 1325 V, 10 ms, 3 Pulse
- c) 1400 V, 20 ms, 1 Puls
- d) 1200 V, 10 ms, 1 Puls



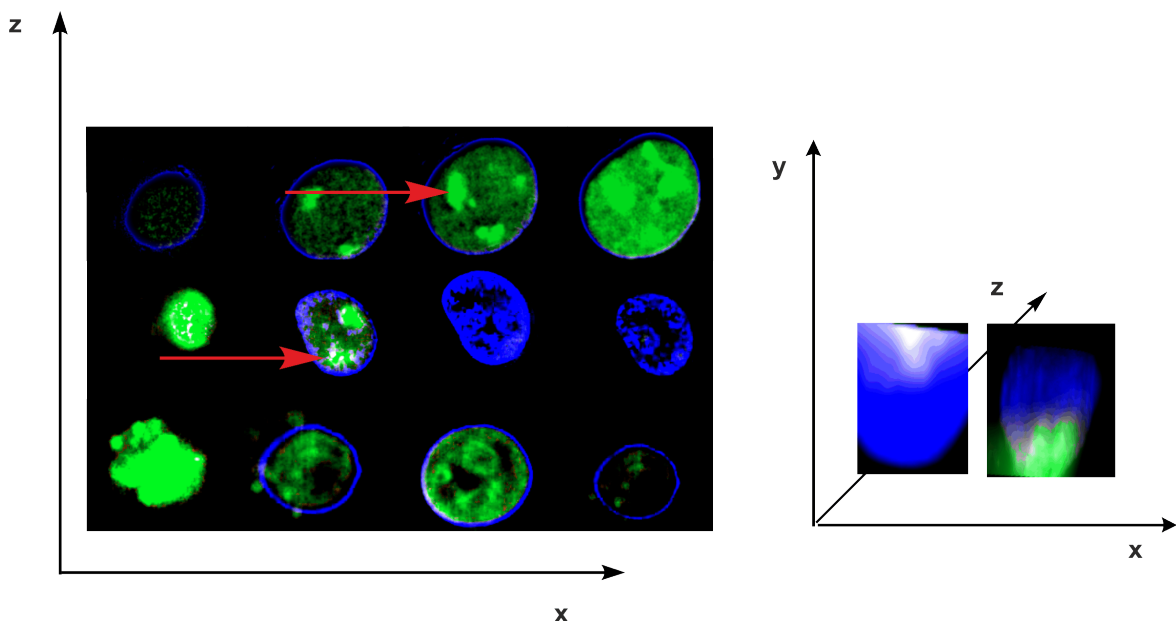
**Abbildung 4.2.4.2** Hellfeld- und Fluoreszenzbilder der T-Zellen nach Elektroporation mit 5  $\mu\text{M}$  der komplementären Sonde (Jurkat-1-L, CCRF-CEM-2-L und Molt-16-3L) unter den jeweils angegebenen Bedingungen. Die Zellen wurden in RPMI gemessen. Die Bildkontraste wurden gleichermaßen bearbeitet. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ . Die Skala beträgt 20  $\mu\text{m}$ .

Bei den Jurkat-Zellen zeigte sich, dass die bereits zuvor verwendete Bedingung c am geeignetsten war. Eine Spannung von 1325 V und einer Pulsdauer von 10 ms (Bedingung a) führte zu einer Verringerung der Sondaufnahme (Vergleich Abbildung 4.2.4.2, 10 min a und c). Wurde die Pulsmenge auf 3 Pulse erhöht (Bedingung b), so resultierte nur eine minimal erhöhte Aufnahme der Sonde (Abbildung 4.2.4.2, 10 min b). Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten nach 120 min bestätigte die Vermutung, dass Bedingung c die vielversprechendsten Einstellungen darstellte. Bei den CCRF-CEM-Zellen ergab sich derselbe Trend. Zwar schien unter Bedingung b ebenfalls ein

Sondentransport in die Zellen stattzufinden, jedoch lag bei der Bedingung c eine erhöhte Effizienz vor (Vergleich Abbildung 4.2.4.2 10 min b und c). Bei den Molt-16-Zellen war eine Anpassung der Bedingungen auf 1200 V, 40 ms und 1 Puls (Bedingung d) notwendig. Höhere Stromstärken bedingten wiederum Schäden der Zellmembran, welche zum Zelltod führten (Anhang, Abbildung 9.2.4.2). Dementsprechend wurden in den nachfolgenden Experimenten die Jurkat- sowie CCRF-CEM-Zellen unter Bedingung c und die Molt-16-Zellen unter Bedingung d elektroporiert.

Zur zeitlichen Abstimmung des optimalen Messzeitpunktes wurden drei Jurkat-Zellen, zuvor elektroporiert mit 5  $\mu$ M **Jurkat-1-L**, über einen Zeitraum von 1 h am Mikroskop vermessen (Anhang, Abbildung 9.2.4.3). Eine Änderung des TO-Signals konnte über den genannten Zeitraum nicht beobachtet werden. Dementsprechend wurden die nachfolgenden Messungen 5 - 20 min nach der Elektroporation durchgeführt.

Des Weiteren wurde die Lokalisation der Sonde innerhalb der Zellen ermittelt. Zur Orientierung diente eine Hoechst-Kernfärbung, die den Zellkern vom Rest der Zelle sichtbar abgrenzte. Über eine z-Stack Aufnahme wurde anschließend eine 3D-Darstellung konstruiert. Die Dekonvolution (Entfernen des Streulichts) ergab ein kontrastreicheres Bild, in der sich die einzelnen Strukturen besser abzeichneten. Dadurch war jedoch das schwächere TO-Signal außerhalb des Zellkerns kaum zu erkennen. Abbildung 4.2.4.3 zeigt drei Jurkat-Zellen mit einer Zellkernfärbung (blau) und der sich darin befindenden FIT-Sonde (grün) in vier xz-Ebenen sowie zwei Zellen in der yx-Ebene. Es konnte hierbei ein erhöhtes Aufkommen der Sonde im Zellkern beobachtet werden. Zusätzlich war eine punktuelle Anreicherung der Sonden zu erkennen (rote Pfeile).



**Abbildung 4.2.4.3** Ausschnitte aus einem z-Stack nach Dekonvolution. Dargestellt sind drei Jurkat-Zellen mit 5  $\mu$ M **Jurkat-1-L** in der zx-Ebene und zwei Zellen in der yx-Ebene. Grün = TO-Emission, Blau = Hoechst 3342. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 545/40 nm, Hoechst3342:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 438/24 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 483/32 nm.

---

### 4.2.5 Kompetitive Hybridisierung mit FIT-Sonden und Cy7-Sonden

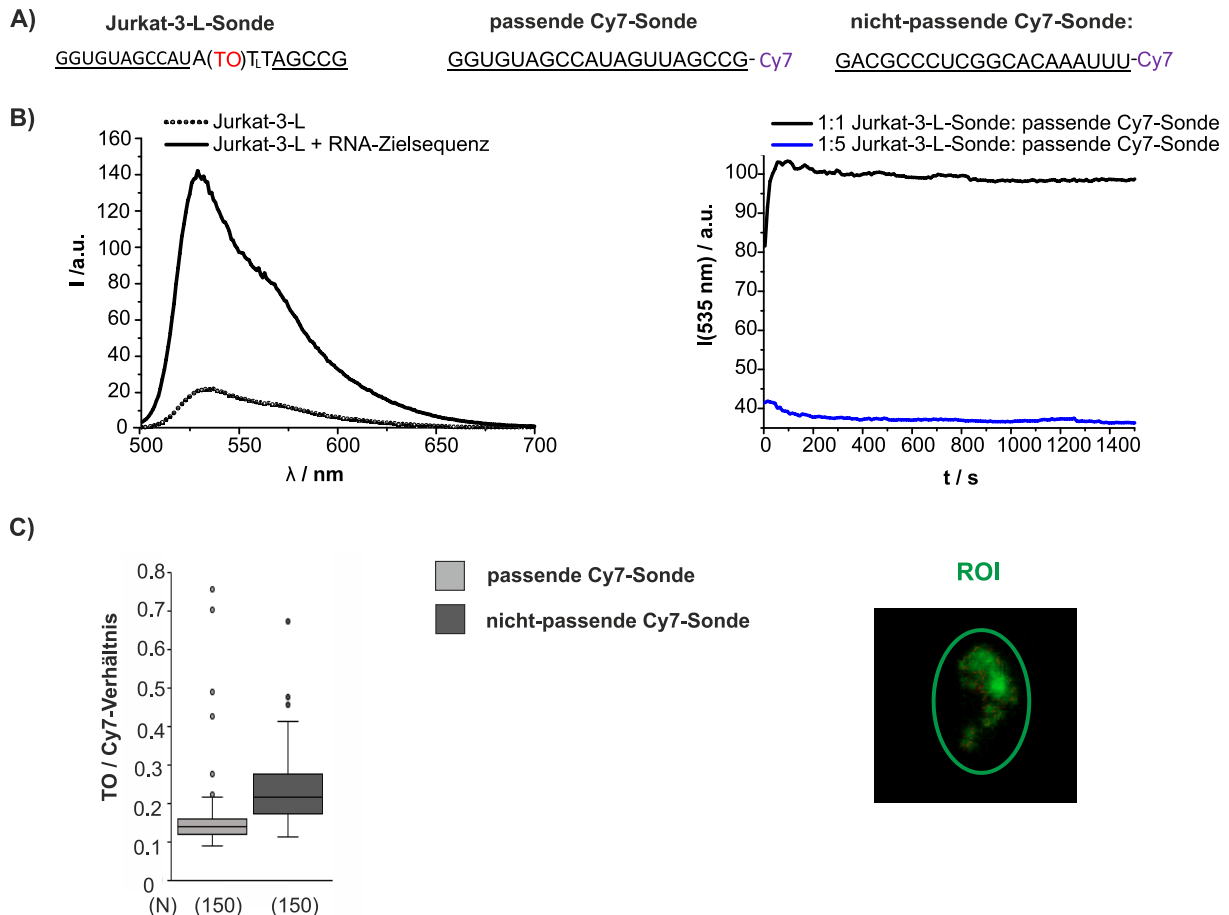
Nachdem die Versuchsbedingungen optimiert wurden sollte der Einsatz der FIT-Sonden in lebenden Zellen stattfinden. Da die T-Zellen unterschiedliche Elektroporationsbedingungen benötigen und dementsprechend verschieden auf die äußeren Einflüsse reagieren, wurde das Prinzip zunächst durch eine kompetitive Hybridisierung an nur einer Zelllinie überprüft.

In den Experimenten wurde die bereits zuvor verwendete **Jurkat-3-L** und eine sequenzidentische, passende Cy7-Sonde sowie eine Cy-Sonde mit einer zufälligen Basensequenz eingesetzt (Abbildung 4.2.5 A). Mit der passenden Cy7-Sonde sollte eine Verdrängung der **Jurkat-3-L** stattfinden, welche es durch Absenken der Fluoreszenzintensität zu detektieren galt. Dafür wurde die Fluoreszenzintensität der **Jurkat-3-L** zunächst im Einzelstrang und nach der Zugabe von 1 Äq. RNA-Zielsequenz sowie nach der Zugabe von 1 und 5 Äq. passender Cy7-Sonde untersucht (Abbildung 4.2.5 B). Die Zugabe von 5 Äq. der passenden Cy7-Sonde bewirkte eine vollständige Verdrängung der FIT-Sonde von der RNA-Zielsequenz. Dies konnte durch eine starke Fluoreszenzerniedrigung beobachtet werden (Abbildung 4.2.5 B). Um das Absenken der Fluoreszenzintensität durch unspezifische Interaktionen auszuschließen wurde ebenfalls eine nicht-passende Cy7-Sonde eingesetzt, bei der keine Verdrängung und somit auch keine Fluoreszenzerniedrigung zu erkennen war.

Die nachfolgenden Zellexperimente wurden mit 500 nM FIT-Sonde und 2.5 µM Cy7-Sonde bei 1400 V, 20 ms und 1 Puls durchgeführt. Demzufolge wurde eine Gesamtkonzentration von 5 µM (Kapitel 4.2.4) nicht überschritten. Zudem konnte das Cy7-Signal als Indikator für eine erfolgreiche Elektroporation herangezogen werden, was den Einsatz niedriger Konzentrationen an FIT-Sonde erlaubte. Die Zugabe der FIT- und der Cy7-Sonden erfolgte zeitgleich während der Elektroporation. Um die Fluoreszenz apoptotischer Zellen aus der Analyse auszuschließen wurden die Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid angefärbt. Es zeigte sich, dass ca. 30% der elektroporierten Zellen ein PI-Signal emittierten (Anhang, Abbildung 9.2.5.1) und somit aus der Auswertung ausgeschlossen werden mussten. Für die ROI-Analyse der spezifischen Region im Zellkern dienten insgesamt 300 Zellen aus drei unterschiedlichen Zellpopulationen (Abbildung 4.2.5 C). Die TO/Cy7-Verhältnisse jeder einzelnen Zelle sind in Abbildung 4.2.6 C in einem Box-Diagramm zusammengefasst. Der Mittelwert der Fluoreszenzemission zeigte sich bei der Elektroporation mit der passenden Cy7-Sonde um über 40% erniedrigt. Dies bestätigte die spezifische Verdrängung der FIT-Sonde und somit das Unterbinden der Hybridisierung mit der mRNA der CDR3-Region. Die Zugabe der nicht-passenden Cy7-Sonde resultierte in einer erhöhten Fluoreszenzemission und

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

somit in einem erhöhten TO/Cy7-Verhältnis. Hier konnte demzufolge eine Verdrängung ausgeschlossen werden. Mithilfe der Experimente konnte die Spezifität der Sonde sowie deren Zugänglichkeit zur CDR3-Region demonstriert werden. Dies lässt schlussfolgern, dass der Prozess der Hybridisierung und die damit einhergehende Fluoreszenzsteigerung einen messbaren Wert darstellt, der mit der hier verwendeten Methodik zur Unterscheidung der Zellen eingesetzt werden kann.

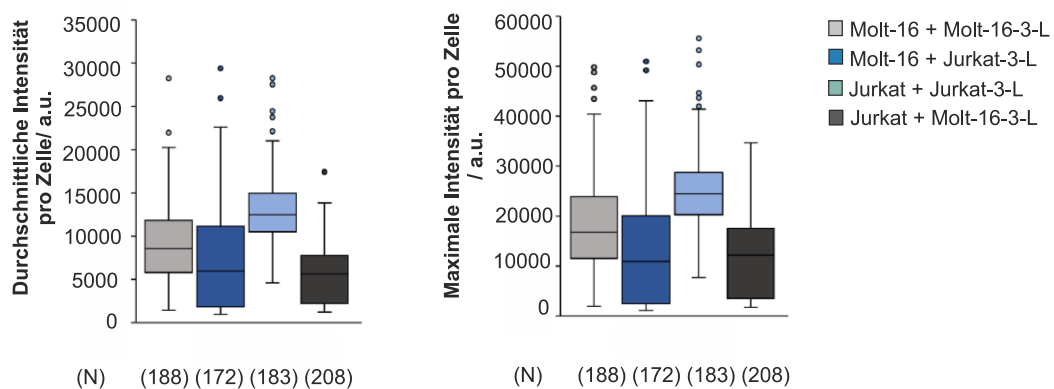


**Abbildung 4.2.5** A) Sequenzen der verwendeten Sonden. B) Fluoreszenzspektrum der **Jurkat-3-L** unter Zugabe von 1 Äq. RNA-Zielsequenz sowie die Änderung der Fluoreszenzintensität bei 535 nm nach Zugabe von 1 und 5 Äq. der passenden-Cy7-Sonde. C) Ergebnisse der Zellexperimente aufgetragen in einem Box-Diagramm. Angegeben sind die TO/Cy7-Verhältnisse und die Anzahl ausgewerteter Zellen (N). Die Auswertung erfolgte mittels ROI (Das Prinzip der Auswertung ist anhand eines Fluoreszenzbildes dargestellt). Sondenkonzentrationen: **Jurkat-3-L** = 0.5 µM und **Cy7-Sonde** = 2.5µM.



### 4.2.6 Zellexperimente mit Jurkat- und Molt-16-Zellen

Es folgten die Zellexperimente mit zwei Zelllinien. Dazu wurden die Jurkat- und Molt-16-Zellen mit jeweils 5  $\mu\text{M}$  **Jurkat-3-L** und 5  $\mu\text{M}$  **Molt-16-3-L** unter den optimierten Bedingungen elektroporiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und mit Propidiumiodid inkubiert. Der Anteil der mit Propidiumiodid angefärbten Zellen betrug ca. 40%. Die Fluoreszenzintensitäten wurden über die ROI-Analyse erhalten (Anhang, Abbildung 9.2.6.1). Abbildung 4.2.6 stellt sowohl die Werte der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität als auch der maximalen Fluoreszenzintensität in einem Box-Diagramm dar. Es wurden biologische Triplikate verwendet, wobei die Anzahl der jeweils ausgewerteten Zellen unter der Box angegeben ist.



**Abbildung 4.2.6** Zwei Box-Diagramme mit den durchschnittlichen und maximalen Fluoreszenzintensitäten der Jurkat- und Molt-16-Zellen nach Elektroporation mit **Jurkat-3-L** und **Molt-16-3-L**. Die Fluoreszenzauswertung erfolgte mittels ROI. N gibt die Anzahl der analysierten Zellen an und der Farbcode die jeweilige Zellen-Sonden-Kombination.

Es ging hervor, dass mit der **Molt-16-3-L** 50% der Molt-16-Zellen einen Intensitätswert größer als 8500 erlangten. Diesen Wert erreichten lediglich 25% der Jurkat-Zellen. Beim Einsatz der **Jurkat-3-L** hatten 75% der Jurkat-Zellen einen Intensitätswert größer als 12000, was nur ca. 25% der Molt-16-Zellen erzielten. Demzufolge konnte unter Verwendung der **Jurkat-3-L** eine signifikante Mehrheit der Jurkat-Zellen und unter Verwendung der **Molt-16-3-L** eine Mehrheit der Molt-16-Zellen markiert werden. Sowohl die durchschnittlichen als auch maximalen Fluoreszenzintensitäten verfolgten hierbei denselben Trend, mit einem Unterschied in der absoluten Intensität.

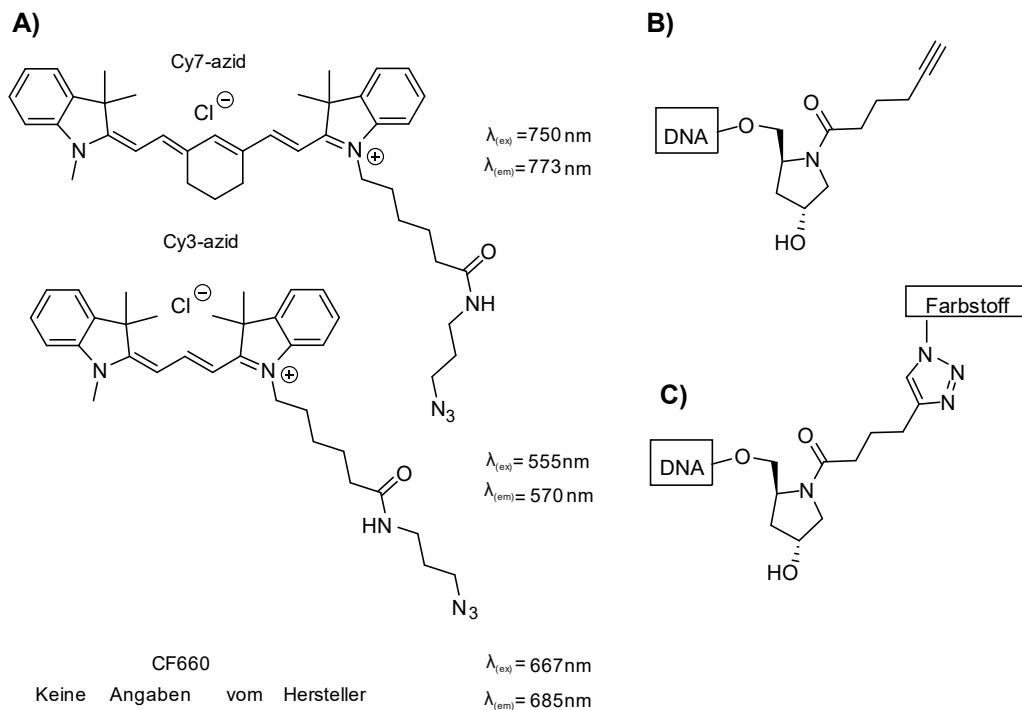
Ein Vergleich der *in vitro* Fluoreszenzwerte beider Sonden zeigte, dass die Einzelstrangfluoreszenz der **Jurkat-3-L**, im Vergleich zur **Molt-16-3-L**, um das Dreifache erhöht vorlag. Jenes könnte die hohe Hintergrundfluoreszenz in den Zellen erklären und der Grund für die breite Intensitätsverteilung der Fluoreszenz in den Molt-16-Zellen sein. Ein signifikanter Unterschied in den Fluoreszenzintensitäten sowie ein zusätzlicher Referenzwert für die Elektroporationseffizienz

wäre für die Auswertung am FACS vorteilhaft. Dafür sollte im Folgenden ein zweiter Farbstoff zur Quantifizierung, bzw. als Referenzwert für die Sondenmenge, dienen. Eine andere Möglichkeit stellte das Prinzip der dualen FIT-Sonden dar.<sup>[58]</sup> Durch einen FRET wäre eine erniedrigte Einzelstrangfluoreszenz als auch eine verbesserte Responsivität nach der Hybridisierung mit der RNA-Zielsequenz denkbar.<sup>[58]</sup>

### 4.2.7 Synthese dual-markierter FIT-Sonden

In Arbeiten von Dr. Elke Socher konnten terminal an die FIT-PNA verknüpfte Farbstoffe zur Verbesserung der TO-Responsivität beitragen.<sup>[58]</sup> Die Anbindung eines ITCC-Farbstoffes an eine FIT-Sonde resultierte in einer 400-fachen Steigerung der TO-Emission nach Hybridisierung mit der Zielsequenz. Zudem konnte die TO-Fluoreszenz nahezu vollständig im Einzelstrang gelöscht werden. Im Folgenden sollte das Prinzip der dualen PNA-FIT-Sonden auf die Mixmer-FIT-Sonden übertragen und deren Fluoreszenzeigenschaften am Spektrometer untersucht werden.

Für die Herstellung der dualen Mixmer-Sonden wurden drei Chromophore mit einem terminalen Azid (Cy3, Cy7 und CF660) im Wellenlängenbereich von 570 - 773 nm, über eine Click-Reaktion an die jeweilige Alkin-DNA-Sonde geknüpft (Abbildung 4.2.7).



**Abbildung 4.2.7** A) Strukturformeln der verwendeten Farbstoffe zur dualen Markierung von Mixmer-FIT-Sonden und die schematische Darstellung von B) Alkin-Linker und C) Bindungsknüpfung von DNA und Farbstoff über die Click-Chemie.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

Dazu dienten vier verschiedene Alkin-Sonden, welche sich in der Position des TO unterschieden. Tabelle 4.2.7.1 zeigt zunächst die Fluoreszenzwerte der Alkin-TO-Mixmer-Sonden im Einzel- und im Doppelstrang bei 535 nm sowie die Fluoreszenzsteigerungen  $I/I_0$ . Die Sonden erreichten Werte zwischen  $I/I_0 = 4.2 - 7.6$ . Die absoluten Fluoreszenzwerte im Einzelstrang waren dabei meist  $< 20$ . Ausschließlich die **Jurkat-a** erreichte eine bereits erhöhte Intensität im Einzelstrang, die eventuell zu einer Verstärkung der Hintergrundfluoreszenz in den Zellen führen könnte.

**Tabelle 4.2.7.1** Jurkat-Alkin-Sonden.

| Sonde           | Sequenz   | $I_{0\ 535nm}$ | $I_{535nm}$ | $I/I_{0\ 535nm}$ |
|-----------------|---|----------------|-------------|------------------|
| <b>Jurkat-a</b> | <u>AGCCGAACAGXT</u> <sub>L</sub> <u>CGAGAAAC</u> -Alkin | 42             | 319         | 7.6              |
| <b>Jurkat-b</b> | <u>AGCCGAACAGGT</u> <sub>L</sub> <u>AGAAAC</u> -Alkin   | 11             | 64          | 5.8              |
| <b>Jurkat-c</b> | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>L</sub> <u>CXGAAAC</u> -Alkin  | 17             | 89          | 5.2              |
| <b>Jurkat-d</b> | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>L</sub> <u>CXGAAAC</u> -Alkin  | 14             | 59          | 4.2              |

Fluoreszenzintensität im Einzelstrang  $I_0$ , Fluoreszenzintensität im Doppelstrang  $I$  und die Fluoreszenzsteigerung  $I/I_0$ . Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37 °C. TO:  $\lambda_{ex} = 485$  nm,  $\lambda_{em} = 535$  nm,  $slit_{ex} = 5$  nm,  $slit_{em} = 5$  nm.

Es folgte die terminale Anbindung eines Cy7-Farbstoffes an die Alkin-Sonden (Tabelle 4.2.7.2). Diese zeigten im Gegensatz zu den unmodifizierten Sonden eine um den Faktor 10 geringere Einzelstrangintensität. Die Fluoreszenzintensitäten nach der Hybridisierung mit der RNA-Zielsequenz lagen ebenfalls um den Faktor sechs erniedrigt. Dieser Effekt könnte auf den Energietransfer vom TO zum Cy7, trotz geringer Überlappung des TO-Emissions- und Cy7-Absorptionsspektrums, zurückgeführt werden. Eine gegenseitige Stoßlöschung im Einzelstrang wäre ebenfalls denkbar. Durch die räumliche Entfernung beider Farbstoffe nach der Hybridisierung, fiel der fluoreszenzerniedrigende Effekt im Doppelstrang geringer aus und verbesserte die Responsivität der **Jurkat-a** und **Jurkat-c** um ca. das Doppelte. Eine zusätzliche Quantifizierung der Sonden wäre hier durch einen zweiten Detektionskanal ebenfalls möglich.<sup>[116]</sup>

**Tabelle 4.2.7.2** Jurkat-Cy7-Sonden.









| Sonde               | Sequenz   | $I_{0\ 535nm}$ | $I_{535nm}$ | $I/I_{0\ 535nm}$ | $I/I_{0\ 773nm}$ |
|---------------------|---|----------------|-------------|------------------|------------------|
| <b>Jurkat-a-Cy7</b> | <u>AGCCGAACAGXT</u> <sub>L</sub> <u>CGAGAAAC</u> -Cy7 | 4.2            | 63          | 15               | 1                |
| <b>Jurkat-b-Cy7</b> | <u>AGCCGAACAGGT</u> <sub>L</sub> <u>AGAAAC</u> -Cy7   | 2.1            | 11          | 5.2              | 1.1              |
| <b>Jurkat-c-Cy7</b> | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>L</sub> <u>CXGAAAC</u> -Cy7  | 1.4            | 16          | 11               | 1.3              |
| <b>Jurkat-d-Cy7</b> | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>L</sub> <u>CXGAAAC</u> -Cy7  | 2              | 13          | 6.5              | 1.2              |

Fluoreszenzintensität im Einzelstrang  $I_0$ , Fluoreszenzintensität im Doppelstrang  $I$  und die Fluoreszenzsteigerung  $I/I_0$ . Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37°C. TO:  $\lambda_{ex} = 485$  nm,  $\lambda_{em} = 535$  nm, Cy7:  $\lambda_{em} = 773$  nm,  $slit_{ex} = 5$  nm,  $slit_{em} = 5$  nm.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

Die Anbindung eines terminalen Cy3-Farbstoffes resultierte in niedrigen Fluoreszenzintensitäten (Tabelle 4.2.7.3). Ein Grund für die sehr geringe TO-Emission im Doppelstrang kann die starke Überlappung des TO-Emissionsspektrums mit dem Cy3-Absorptionsspektrum sein. Diese führt zu einem FRET vom TO zum Cy3, was eine erhöhte Emission bei 570 nm bedingt. Durch die erhöhte TO-Emission nach der Hybridisierung mit der Zielsequenz stieg ebenfalls die Cy3-Emission. Die Responsivität des Cy3 war trotz dessen zu gering um für die RNA-Detektion eingesetzt zu werden.









**Tabelle 4.2.7.3** Jurkat-Cy3-Sonden.

| Sonde               | Sequenz   | $I_{0\ 535\text{nm}}$ | $I_{535\text{nm}}$ | $I/I_{0\ 535\text{nm}}$   | $I/I_{0\ 570\text{nm}}$   |
|---------------------|---|-----------------------|--------------------|---|---|
| <b>Jurkat-a-Cy3</b> | <u>AGCCGAACAGXT</u> <sub>L</sub> <u>CGAGAAAC</u> -Cy3 | 5.3                   | 21                 |  3.9 |  2.2 |
| <b>Jurkat-b-Cy3</b> | <u>AGCCGAACAGGTXG</u> <sub>L</sub> <u>AGAAAC</u> -Cy3 | 3.7                   | 8.7                |  2.3 |  2.2 |
| <b>Jurkat-c-Cy3</b> | <u>AGCCGAACAGGUCGXG</u> <sub>L</sub> <u>AAAC</u> -Cy3 | 3.5                   | 10                 |  2.8 |  2.6 |
| <b>Jurkat-d-Cy3</b> | <u>AGCCGAACAGGUCGAGXA</u> <sub>L</sub> <u>AC</u> -Cy3 | 3.5                   | 8.1                |  2.3 |  2.3 |

Fluoreszenzintensität im Einzelstrang  $I_0$ , Fluoreszenzintensität im Doppelstrang  $I$  und die Fluoreszenzsteigerung  $I/I_0$ . Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37°C. TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 485\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 535\text{ nm}$ , Cy3:  $\lambda_{\text{em}} = 570\text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{ex}} = 5\text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{em}} = 5\text{ nm}$ .

Der CF660-Farbstoff, der bei 682 nm mit maximaler Intensität fluoresziert, übte keinen positiven Einfluss auf die TO-Emission aus (Tabelle 4.2.7.4). Es zeigten sich keine verbesserten Fluoreszenzwerte im Vergleich zu den Alkin-Sonden. Somit war der CF660-Farbstoff nicht weiter von Interesse.

**Tabelle 4.2.7.4** Jurkat-CF660-Sonden.

| Sonde                 | Sequenz   | $I_{0\ 535\text{nm}}$ | $I_{535\text{nm}}$ | $I/I_{0\ 535\text{nm}}$   | $I/I_{0\ 682\text{nm}}$   |
|-----------------------|---|-----------------------|--------------------|---|---|
| <b>Jurkat-a-CF660</b> | <u>AGCCGAACAGXT</u> <sub>L</sub> <u>CGAGAAAC</u> -CF660 | 11                    | 63                 |  5.7 |  2   |
| <b>Jurkat-b-CF660</b> | <u>AGCCGAACAGGTXG</u> <sub>L</sub> <u>AGAAAC</u> -CF660 | 16                    | 23                 |  1.4 |  1.4 |
| <b>Jurkat-c-CF660</b> | <u>AGCCGAACAGGUCGXG</u> <sub>L</sub> <u>AAAC</u> -CF660 | 6.6                   | 22                 |  3.3 |  1.5 |
| <b>Jurkat-d-CF660</b> | <u>AGCCGAACAGGUCGAGXA</u> <sub>L</sub> <u>AC</u> -CF660 | 6.4                   | 19                 |  2.9 |  1.7 |

Fluoreszenzintensität im Einzelstrang  $I_0$ , Fluoreszenzintensität im Doppelstrang  $I$  und die Fluoreszenzsteigerung  $I/I_0$ . Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37°C. TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 485\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 535\text{ nm}$ , CF660:  $\lambda_{\text{em}} = 682\text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{ex}} = 5\text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{em}} = 5\text{ nm}$ .

Der Cy7-Farbstoff erwies sich somit für die nachfolgenden Anwendungen am geeignetsten. Aus diesem Grund wurden jeweils drei Cy7-TO-Sonden für jede Zelllinie hergestellt. Eine genügend große Distanz zwischen beiden Farbstoffen sollte eine ausreichend hohe Fluoreszenzintensität im Doppelstrang sicherstellen und trotz dessen das Löschen der Einzelstrangfluoreszenz ermöglichen. Tabelle 4.2.7.5 zeigt die Fluoreszenzemission im Einzel- und Doppelstrang sowie die Fluoreszenzsteigerung bei 535 nm und 773 nm.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

Die **Jurkat-f-Cy7** erreichte einem Fluoreszenzanstieg von  $I/I_0 = 15$  und die **CCRF-CEM-a-Cy7** einem Anstieg von  $I/I_0 = 63$ . Die beiden Sonden erzielten somit die höchsten Responsivitäten mit einer zusätzlich geringen Fluoreszenzintensität im Einzelstrang. Die Fluoreszenzeigenschaften der Molt-Sonden fielen hingegen ab.

**Tabelle 4.2.7.5** Molt-16-, Jurkat- und CCRF-CEM-Cy7-Sonden

| Sonde                 | Sequenz  | $I_0$ 535nm | $I$ 535nm | $I/I_0$ 535nm | $I/I_0$ 773nm |
|-----------------------|--|-------------|-----------|---------------|---------------|
| <b>Molt-16-a-Cy7</b>  | UGCGUAU <u>CTG</u> <sub>L</sub> XTACGCCCCC-dye | 9           | 45        | 5             | 1.1           |
| <b>Molt-16-b-Cy7</b>  | AUACUGCGUA <u>TXT</u> <sub>L</sub> GUUACGC-dye | 2.6         | 14        | 5.3           | 1.4           |
| <b>Molt-16-c-Cy7</b>  | UGCGT <u>XT</u> <sub>L</sub> CUGUUACGCCCCC-dye | 15          | 103       | 6.8           | 0.7           |
| <b>Jurkat-e-Cy7</b>   | GGUGUAGCCAUAX <u>T</u> <sub>L</sub> TAGCCG-dye | 3.1         | 21        | 6.7           | 1.4           |
| <b>Jurkat-f-Cy7</b>   | GGT <u>XT</u> <sub>L</sub> AGCCAUAGUUAGCCG-dye | 6.7         | 98        | 15            | 1             |
| <b>Jurkat-g-Cy7</b>   | GGUG <u>T</u> <sub>L</sub> XGCCAUAGUUAGCCG-dye | 3.4         | 28        | 8.2           | 1             |
| <b>CCRF-CEM-a-Cy7</b> | U <u>CT</u> <sub>L</sub> CCCAAGGCUGCUGGC-dye   | 1.8         | 114       | 63            | 1.1           |
| <b>CCRF-CEM-b-Cy7</b> | UCUG <u>T</u> <sub>L</sub> XCCAAGGCUGCUGGC-dye | 7.9         | 41        | 5.2           | 1             |
| <b>CCRF-CEM-c-Cy7</b> | UCUGUCX <u>C</u> <sub>L</sub> AAGGCUGCUGGC-dye | 16          | 76        | 4.7           | 1             |

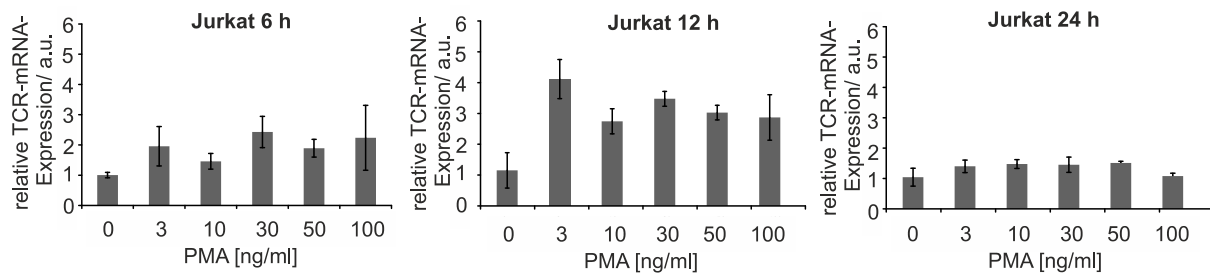
Fluoreszenzintensität im Einzelstrang  $I_0$ , Fluoreszenzintensität im Doppelstrang  $I$  und die Fluoreszenzsteigerung  $I/I_0$ . Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37°C. TO:  $\lambda_{ex}$  = 485 nm,  $\lambda_{em}$  = 535 nm, Cy7:  $\lambda_{em}$  = 773 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

### 4.2.8 Stimulation der Expression des TCR

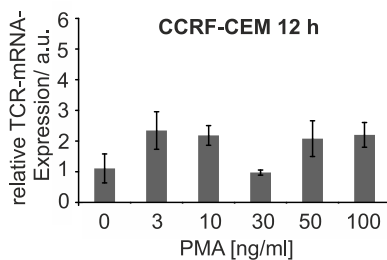
Nach der Optimierung des experimentellen Ablaufs und der Eigenschaften der Sonden wurde nach Möglichkeiten gesucht die Menge an mRNA durch Stimulation der Zellen zu erhöhen. Eine erhöhte Menge an Zielsequenz könnte ein verstärktes Signal der FIT-Sonden und somit leichtere Unterscheidung der Zellen ermöglichen.<sup>[58, 117]</sup> Da die Elektroporation der Jurkat- und CCRF-CEM-Zellen unter den gleichen Bedingungen gelingt und letztendlich an einer Mischpopulation gemessen werden sollte, konzentrierten sich die im Folgenden geschilderten Untersuchungen auf diese beiden Zelllinien. Noonan *et al.* zeigten, dass die Stimulation der TCR-Expression in EL4+-Zellen durch Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) möglich war.<sup>[117]</sup> Dementsprechend wurden die Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen Mengen an PMA (3 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml, 50 ng/ml und 100 ng/ml) über verschiedene Zeiträume (6 h, 12 h und 24 h) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Es folgte die RNA-Isolation aus den verschiedenen Proben. Die Echtzeit-PCR der cDNA wurde im Anschluss mit biologischen Triplikaten und dem Einsatz von *fast SYBRGreen*<sup>TM</sup> durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.8 A als Balkendiagramm dargestellt.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

A)



B)



**Abbildung 4.2.8** PCR-Analyse der TCR-Expression in A) Jurkat-Zellen und in B) CCRF-CEM-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Mengen an PMA in DMSO. Die Echtzeit-PCR wurde mit einem *SYBRGreen*<sup>TM</sup> PCR-Kit durchgeführt.

Die Menge exprimierter TCR-mRNA konnte in den Jurkat-Zellen durch die Inkubation mit 3 ng/ml PMA über 12 h um das 4-fache erhöht werden. Dies bestätigte die Ergebnisse der EL4+-Zellen anhand der Jurkat-Zellen. Die Inkubationszeit übte dabei einen signifikanten Einfluss auf die Stärke der Stimulation aus, wobei der Einfluss der PMA-Konzentration vergleichsweise gering ausfiel. In den CCRF-CEM-Zellen konnte das mRNA-Level unter denselben Bedingungen um das 2.5-fache erhöht werden. Die Stimulation mit 10 ng/ml über 12 h lieferte vergleichbare Werte. Für die Durchführung der Experimente war es jedoch vorteilhaft identische Bedingungen anzuwenden, um letztendlich das Sortieren einer Mischpopulation zu gewährleisten.

### 4.2.9 Zellexperimente mit Jurkat- und CCRF-CEM-Zellen

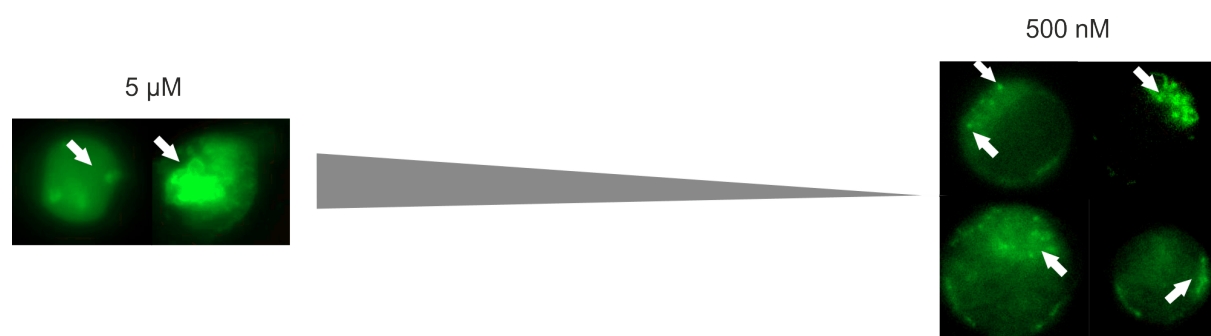
Es folgten die Zellexperimente mit den CCRF-CEM-Zellen und den Jurkat-Zellen, unter Einsatz der TO-Cy7-Sonden (**Jurkat-f-Cy7** und **CCRF-CEM-a-Cy7**) sowie identischen Versuchs- und Stimulationsbedingungen. Anhand der Werte aus Tabelle 4.2.9.1 konnten die theoretisch in der Zelle zu erwarteten TO/Cy7-Verhältnisse zuvor berechnet werden. Diese lagen für die **Jurkat-f-Cy7** bei 0.1 im Einzelstrang und 1.6 im Doppelstrang. Für die **CCRF-CEM-a-Cy7** befanden sich die Werte bei 0.03 im Einzelstrang und 2.1 im Doppelstrang.

**Tabelle 4.2.9.1** Fluoreszenzwerte der ausgewählten TO-Cy7-Sonden.

| Sonde               | $I_0$ (535 nm) | $I$ (535 nm) | $I_0$ (773 nm) | $I$ (773 nm) | $I_0$ (535 nm) / $I_0$ (773 nm) | $I$ (535 nm) / $I$ (773 nm) |
|---------------------|----------------|--------------|----------------|--------------|---------------------------------|-----------------------------|
| <b>Jurkat-f-Cy7</b> | 6.7            | 98           | 58             | 59           | 0.1                             | 1.6                         |
| <b>CEM-a-Cy7</b>    | 1.8            | 114          | 46             | 54           | 0.03                            | 2.1                         |

Fluoreszenzintensität im Einzelstrang  $I_0$ , Fluoreszenzintensität im Doppelstrang  $I$  und die Fluoreszenzsteigerung  $I/I_0$  Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37°C. TO:  $\lambda_{ex}$  = 485 nm,  $\lambda_{em}$  = 535 nm, Cy7:  $\lambda_{em}$  = 773 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

Da durch das Cy7 ein Referenzfarbstoff zur Überprüfung der Transfektionseffizienz vorhanden war, konnte auch hier die Konzentration der Sonden reduziert werden (2.5  $\mu$ M und 0.5  $\mu$ M). Bestätigt wurde die Überlegung durch die in Abbildung 4.2.9.1 dargestellten Fluoreszenzbilder. Bei der Verwendung von 0.5  $\mu$ M Sonde zeichneten sich deutlichere Strukturen ab als bei dem Einsatz von 5  $\mu$ M Sonde (siehe weiße Pfeile).



**Abbildung 4.2.9.1** Fluoreszenzaufnahmen der TO-Emission von Jurkat-Zellen nach Elektroporation mit 0.5  $\mu$ M und 5  $\mu$ M **Jurkat-1-L**, gemessen mit einem 60 x Ölobjektiv (Filter: TO:  $\lambda_{ex}$  = 500/24 nm,  $\lambda_{em}$  = 545/40 nm).

Um den Einfluss der Stimulation auf die Ergebnisse zu überprüfen wurden jeweils die Hälfte der Zellen 12 h mit 3 ng/ml PMA stimuliert und erst anschließend elektroporiert. Für die Auswertung wurden die fluoreszenten Regionen mittels ROI analysiert sowie die durchschnittliche Fluoreszenzintensität und die daraus resultierenden TO/Cy7-Verhältnisse berechnet (Anhang, Abbildung 9.2.9.1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2.9.2 und Tabelle 4.2.9.3 aufgezeigt.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

**Tabelle 4.2.9.2** Ergebnisse der Jurkat-Zellexperimente.

| Bedingungen   | Experiment                    | TO   | Cy7  | TO/Cy7 | Zellen |
|---|-------------------------------|------|------|--------|--------|
| Stimulation mit 3 ng/mL PMA und Elektroporation mit 0.5 $\mu$ M Sonde | Jurkat + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 1769 | 976  | 1.8    | 39     |
|   | Jurkat + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 2073 | 1427 | 1.4    | 40     |
|   | Jurkat + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 1944 | 1487 | 1.3    | 35     |
|   | Jurkat + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 1781 | 1444 | 1.2    | 52     |
|   | Jurkat + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 1848 | 1438 | 1.3    | 36     |
|   | Jurkat + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 1816 | 1691 | 1.1    | 43     |
| Stimulation mit 3 ng/mL PMA und Elektroporation mit 2.5 $\mu$ M Sonde | Jurkat + Jurkat 2.5 $\mu$ M   | 4701 | 6032 | 0.77   | 48     |
|   | Jurkat + CCRF-CEM 2.5 $\mu$ M | 4251 | 5695 | 0.74   | 24     |
|   | Jurkat + Jurkat 2.5 $\mu$ M   | 6959 | 9719 | 0.71   | 36     |
|   | Jurkat + CCRF-CEM 2.5 $\mu$ M | 5674 | 9176 | 0.61   | 40     |
| ohne Behandlung mit PMA und Elektroporation mit 0.5 $\mu$ M Sonde     | Jurkat + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 1936 | 1722 | 1.12   | 56     |
|   | Jurkat + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 1806 | 1630 | 1.10   | 40     |
|   | Jurkat + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 2266 | 1644 | 1.3    | 27     |
|   | Jurkat + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 1844 | 1641 | 1.12   | 34     |
|   | Jurkat + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 2069 | 2348 | 0.9    | 23     |
|   | Jurkat + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 2433 | 2088 | 1.2    | 26     |

Es sind die Mittelwerte der jeweiligen Fluoreszenzintensität nach der Elektroporationen der Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von **Jurkat-f-Cy7** und **CCRF-CEM-a-Cy7** in folgender Tabelle angegeben. Identische Zellpopulationen wurden farblich markiert. N gibt die Anzahl der analysierten Zellen an. Die Analyse erfolgte jeweils mittels ROI durch Umkreisen der Zelle. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40$  nm, Cy7:  $\lambda_{\text{ex}} = 740/75$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 810/90$  nm.

Die Elektroporation der stimulierten Jurkat-Zellen mit 0.5  $\mu$ M **Jurkat-f-Cy7** führte zu einem durchschnittlichen TO/Cy7-Verhältnis von ca. 1.6. Das Ergebnis glich somit den Werten aus der *in vitro* Messung (Tabelle 4.2.9.1). Im Vergleich dazu erreichten die nicht-stimulierten Zellen lediglich ein Verhältnis von 1.1. Eine Verbesserung der Fluoreszenzintensität des TO war durch die vorherige Stimulation und der damit einhergehenden Erhöhung der Menge an Zielsequenz möglich. Der Einsatz von 2.5  $\mu$ M Sonde resultierte in einem geringeren TO/Cy7-Verhältnis. Grund hierfür könnte die größere Menge an ungebundener Sonde in den Zellen sein, die zu einer Verschlechterung Werte beitrug. 0.5  $\mu$ M der **CCRF-CEM-a-Cy7** lieferte in den stimulierten Jurkat-Zellen lediglich ein Verhältnis von 1.2. Hier wäre eine Unterscheidung der Zellen mithilfe von 0.5  $\mu$ M FIT-Sonden möglich gewesen.



## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

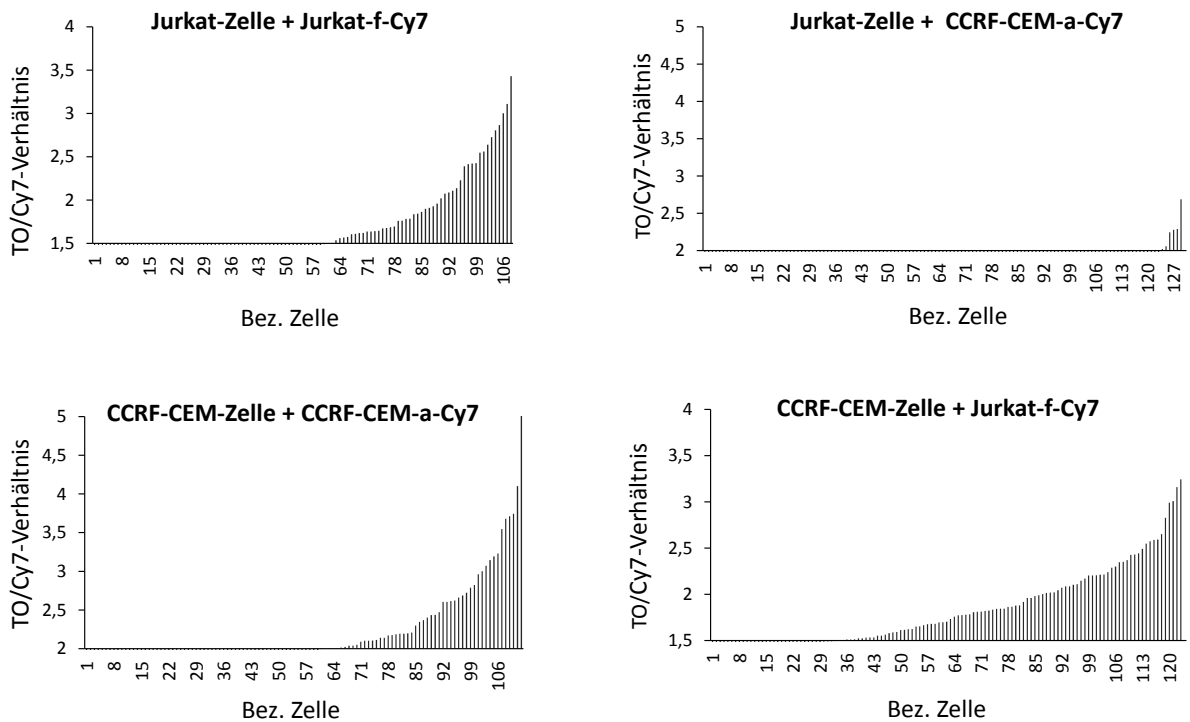
**Tabelle 4.2.9.3** Ergebnisse der CCRF-CEM-Zellexperimente.

| Bedingungen   | Experiment                      | TO   | Cy7  | TO/Cy7 | Zellen |
|---|---------------------------------|------|------|--------|--------|
| Stimulation mit 3 ng/mL PMA und Elektroporation mit 0.5 $\mu$ M Sonde | CCRF-CEM + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 2140 | 950  | 2.2    | 33     |
|   | CCRF-CEM + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 1843 | 1063 | 1.7    | 58     |
|   | CCRF-CEM + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 1856 | 1108 | 1.7    | 43     |
|   | CCRF-CEM + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 1924 | 1209 | 1.6    | 53     |
|   | CCRF-CEM + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 1634 | 860  | 1.9    | 40     |
|   | CCRF-CEM + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 1941 | 1075 | 1.8    | 26     |
| Stimulation mit 3 ng/mL PMA und Elektroporation mit 2.5 $\mu$ M Sonde | CCRF-CEM + CCRF-CEM 2.5 $\mu$ M | 6174 | 6175 | 0.99   | 33     |
|   | CCRF-CEM + Jurkat 2.5 $\mu$ M   | 4791 | 6748 | 0.7    | 39     |
|   | CCRF-CEM + CCRF-CEM 2.5 $\mu$ M | 4980 | 5818 | 0.9    | 41     |
|   | CCRF-CEM + Jurkat 2.5 $\mu$ M   | 6867 | 7315 | 0.9    | 70     |
| Ohne Behandlung mit PMA und Elektroporation mit 0.5 $\mu$ M Sonde     | CCRF-CEM + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 1634 | 1148 | 1.4    | 49     |
|   | CCRF-CEM + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 1915 | 1518 | 1.2    | 65     |
|   | CCRF-CEM + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 1892 | 1642 | 1.2    | 94     |
|   | CCRF-CEM + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 2223 | 1641 | 1.3    | 55     |
|   | CCRF-CEM + CCRF-CEM 0.5 $\mu$ M | 2021 | 1618 | 1.2    | 35     |
|   | CCRF-CEM + Jurkat 0.5 $\mu$ M   | 1957 | 1327 | 1.5    | 31     |

Es sind die Mittelwerte der jeweiligen Fluoreszenzintensität nach Elektroporationen der CCRF-CEM-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von **Jurkat-f-Cy7** und **CCRF-CEM-a-Cy7** in folgender Tabelle angegeben. Identische Zellpopulationen wurden farblich markiert. N gibt die Anzahl der analysierten Zellen an. Die Analyse erfolgte jeweils mittels ROI durch Umkreisen der Zelle. Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40$  nm, Cy7:  $\lambda_{\text{ex}} = 740/75$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 810/90$  nm.

Die CCRF-CEM-Zellen erreichten mit der **CCRF-CEM-a-Cy7** ein Verhältnis von 1.9. Im Gegensatz dazu konnte mit der **Jurkat-f-Cy7** ein Verhältnis von 1.7 beobachtet werden (Tabelle 4.2.9.3). Auch hier erzielten die stimulierten Zellen, im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen, verbesserte Werte. Auffällig waren jedoch die starken Schwankungen der TO/Cy7-Verhältnisse innerhalb der Messreihe sowie ein TO/Cy7-Verhältnis von 2.2. Dieser Wert sollte laut der *in vitro* Messungen nicht zu erreichen sein. Dementsprechend wurden im Folgendem die Fluoreszenzwerte jeder einzelnen Zelle separat aufgeführt, wobei sich ausschließlich auf die Messungen mit 0.5  $\mu$ M Sonde und vorheriger Stimulation der Zellen beschränkt wurde. In Abbildung 4.2.9.4 sind die TO/Cy7-Verhältnisse jeder einzelnen Zelle angegeben. Zusätzlich wurde mit den Werten aus der Tabelle 4.2.9.1 ein Schwellenwert festgelegt, der eine Trennung der Zelllinien ermöglichen sollte. Für die **Jurkat-f-Cy7** lag der Schwellenwert bei 1.5 und für die **CCRF-CEM-a-Cy7** bei 2.0. Überstiegen die Zellen mit der jeweiligen Sonde diesen Wert, so wurden sie als „positiv“ markiert und wären somit theoretisch selektiert worden.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

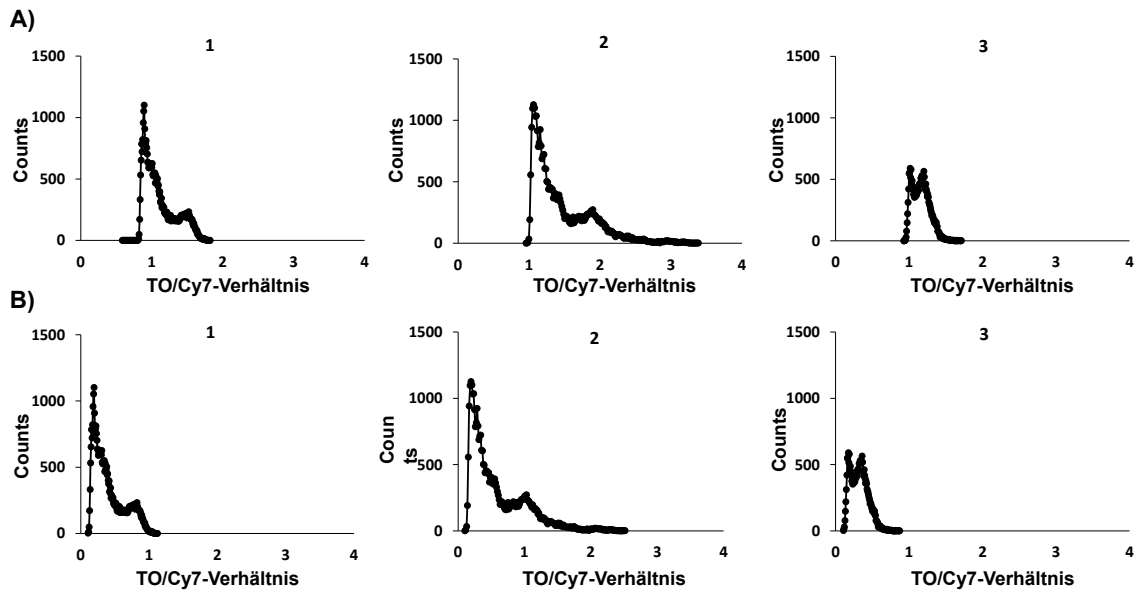


**Abbildung 4.2.9.2** Balkendiagramme der TO/Cy-Verhältnisse jeder einzelnen Zelle nach Elektroporation mit 0.5  $\mu$ M **Jurkat-f-Cy7** und **CCRF-CEM-a-Cy7**. Für die **Jurkat-f-Cy7** wurde ein Schwellenwert von TO/Cy7 = 1.5 und für die **CCRF-CEM-a-Cy7** ein Schwellenwert von TO/Cy7 = 2.0 festgelegt. Bez. Zelle = Bezeichnung (Nummer) der Zelle.

Eine erhöhte Menge an „positiver“ Jurkat-Zellen konnte beim Einsatz der **Jurkat-f-Cy7**, verglichen mit der **CCRF-CEM-a-Cy7**, erhalten werden. Im Fall der CCRF-CEM-Zellen war die Anzahl der als „positiv“ markierten Zellen unter Verwendung beider Sonden ähnlich. Die TO/Cy7-Verhältnisse lagen mit der **CCRF-CEM-a-Cy7** jedoch signifikant höher. Da die hier ermittelten TO/Cy7-Verhältnisse höher als die in der Küvette lagen, war es notwendig diese genauer zu betrachten. Die mögliche Autofluoreszenz der Zellen konnte diesen Effekt verursacht haben. Die Einflüsse mussten dementsprechend in der Auswertung beachtet werden. Aus diesem Grund sollte eine feinere Auswertmethode eingesetzt werden. Mithilfe der Software *ImageJ* war es möglich zusätzliche Analysefunktionen zu nutzen, welche die *Olympus* Software IX3 nicht lieferte. Für die weiteren Analysen wurden die Fluoreszenzbilder als *stack* in der Reihenfolge BF-TO-PI-Cy7 abgespeichert und als TIF-Datei in die *ImageJ*-Software importiert. Es wurde mit der Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz außerhalb der Zellen begonnen. Dafür mussten die Zellen zunächst mit der Funktion *threshhold* markiert und so vom Hintergrund abgegrenzt werden (Makro-1, Anhang, Abbildung 9.2.9.3 und Abbildung 9.2.9.4). Sobald die Zellen rot hinterlegt waren wurde der Hintergrund subtrahiert. Es folgte die Berechnung der TO/Cy7-Verhältnisse für jedes Pixel (Makro-2, Anhang, Abbildung 9.2.9.5 und Abbildung 9.2.9.6). Durch die ROI-Analyse konnten die Verhältnisse als Histogramm mit der jeweiligen Anzahl der dazugehörigen Pixel (*Counts*)

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

dargestellt werden (Abbildung 4.2.9.3 A). Die *Counts* der TO/Cy7-Verhältnisse zeigten in den beispielhaften Histogrammen ein Maximum um den Wert 1. Das Histogramm in Abbildung 4.2.9.3 A 2 erreichte zudem ein Verhältnis von 3.5, welches laut Tabelle 4.2.9.1 nicht möglich sein sollte. Somit wurde das jeweils erste detektierte TO/Cy7-Verhältnis auf das kleinstmögliche TO/Cy7-Verhältnis aus Tabelle 4.2.9.1 heruntergesetzt. Damit wurde eine Hintergrundfluoreszenzkorrektur innerhalb der Zellen sichergestellt (Abbildung 4.2.9.3 B).



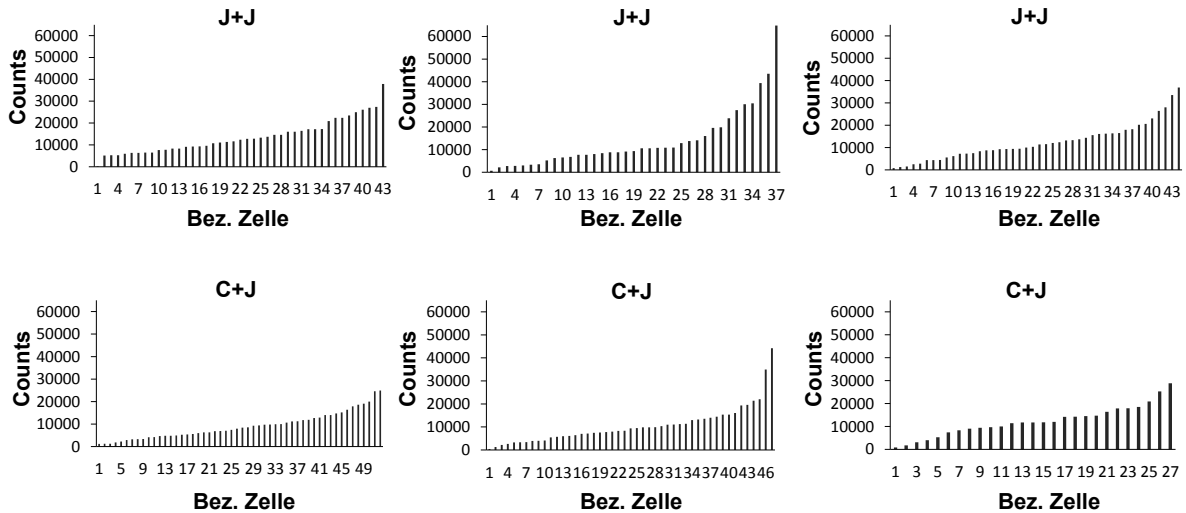
**Abbildung 4.2.9.3** Die Histogramme dreier verschiedener Jurkat-Zellen nach der Elektroporation mit **Jurkat-f-Cy7**, ausgewertet durch *ImageJ*. A) unbearbeitetes Histogramm B) angepasstes Histogramm (Der erste Count wurde auf das kleinstmögliche Verhältnis aus der Küvettenmessung angepasst.).

In den nachfolgenden Auswertungen erfolgte dementsprechend eine Subtraktion des Hintergrundsignals außerhalb der Zellen (Makro-1), gefolgt von der Berechnung der TO/Cy7-Verhältnisse innerhalb der Zellen (Makro-2) und der Hintergrundfluoreszenzkorrektur innerhalb der Zellen, durch das Anpassen der TO/Cy7-Verhältnisse auf die Werte in Tabelle 4.2.9.1. Die Summe aller *Counts* (Summe der TO/Cy7-Werte) wurde für jede einzelne Zelle in einem Balkendiagramm in Abbildung 4.2.9.4 illustriert. Es wurde folglich für jede analysierte Zelle ein Intensitätswert erhalten. Durch Festlegen eines Schwellenwertes von 25 000 *Counts* konnte der Großteil der Zellen vernachlässigt werden, wodurch nur vereinzelt Zellen als „positiv“ markiert wurden. Unterhalb dieses Schwellenwertes lag die Anzahl der „positiven Zellen“ so hoch, sodass kaum eine Unterscheidung zwischen den Zelllinien getroffen hätte werden können. Bei der Elektroporation der Jurkat-Zellen mit der **Jurkat-f-Cy7** überschritten 11% der Zellen diesen Schwellenwert. Im Vergleich dazu wurden nur 2% der CCRF-CEM-Zellen als falsch-positiv markiert (Abbildung 4.2.9.4 A). Mit der **CCRF-CEM-a-Cy7** erreichten 6% der CCRF-CEM-Zellen und nur 0.8% der Jurkat-Zellen den Schwellenwert. Dies bedeutet, dass die mit der **Jurkat-f-Cy7** markierten

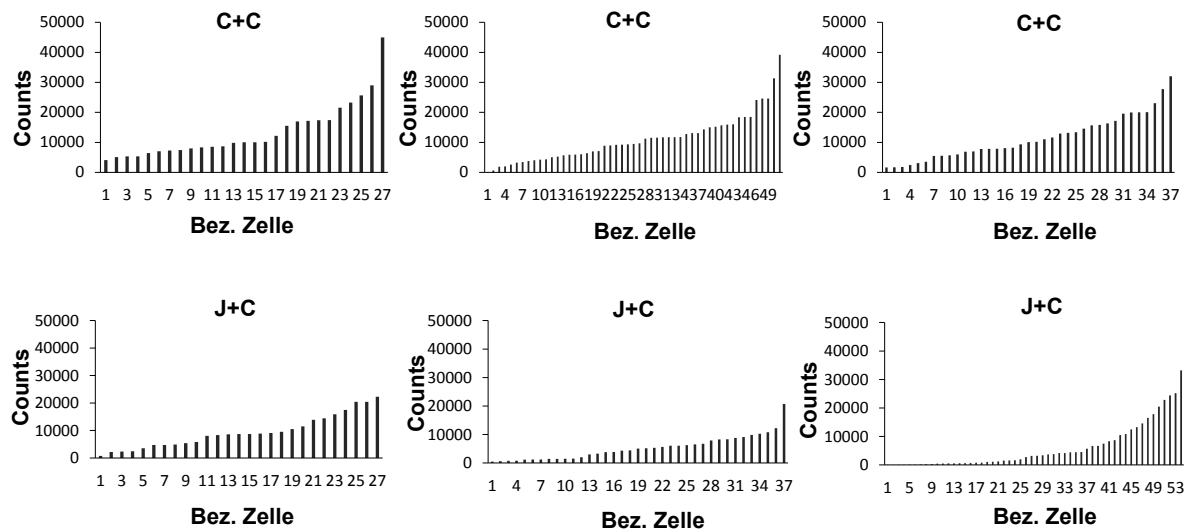
## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

Zellen zu 82% die Jurkat-Zellen darstellten. Der Anteil der CCRF-CEM-Zellen mit der **CCRF-CEM-a-Cy7** lag bei 87%. Rechnet man das Ergebnis auf die Anzahl an Zellen in einem FACS-Experiment (10 000 Zellen), so könnte eine ausreichende Menge für die anschließende Kultivierung isoliert werden.

A)



B)



**Abbildung 4.2.9.4** Balkendiagramme der zuvor mit *ImageJ* ausgewerteten Zellen. Hierfür erfolgte zunächst eine Subtraktion des Hintergrundsignals außerhalb der Zellregion, gefolgt von der Berechnung der TO/Cy7-Verhältnisse innerhalb der Zelle, Auswahl der spezifischen Region (ROI) sowie der Hintergrundkorrekturen innerhalb der Zelle. A) Messungen von drei verschiedenen Jurkat-Populationen mit beiden Sonden. B) Messungen von drei verschiedenen CCRF-CEM-Populationen mit beiden Sonden (**Jurkat-f-Cy7** und **CCRF-CEM-a-Cy7**). Der erste Buchstabe steht für die Zelllinie und der zweite für die Sonde. J = Jurkat und C = CCRF-CEM.

---

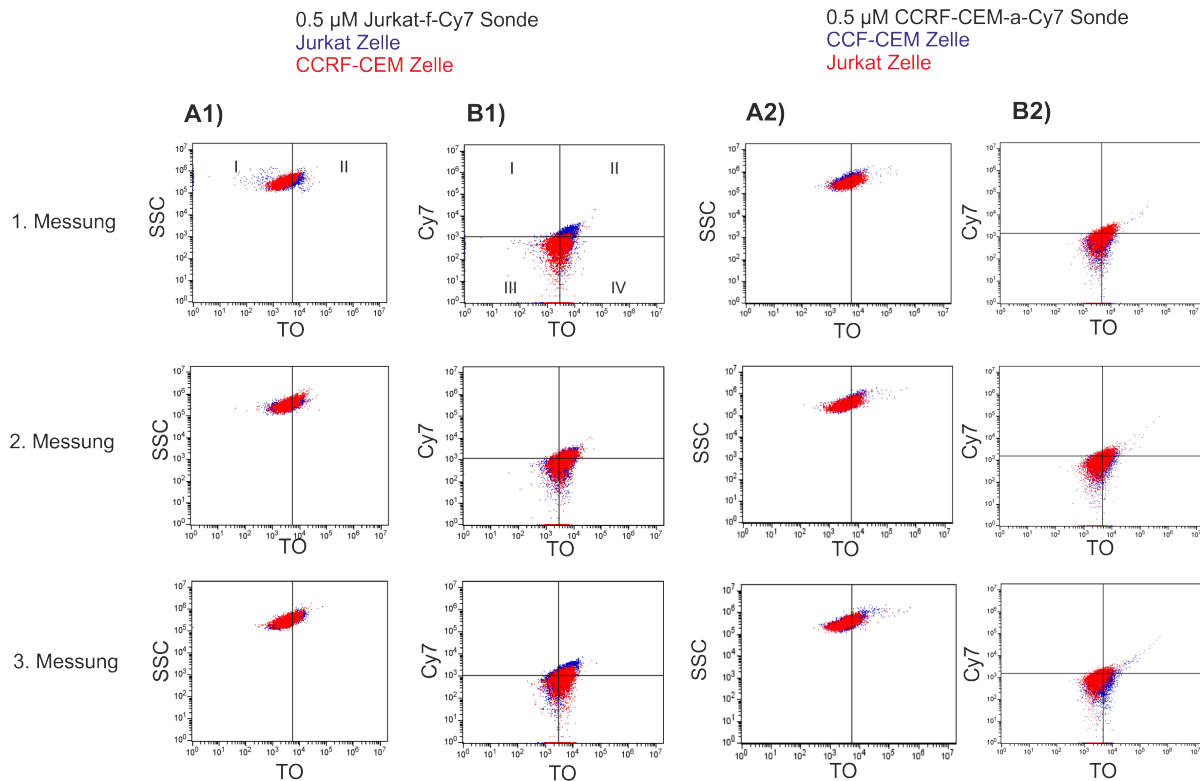
### 4.2.10 Messungen am Durchflusszytometer

Nach der Auswertung mit *ImageJ* folgte die Analyse am Durchflusszytometer. Die Messung sollte die Eignung für die FACS-Anwendungen überprüfen.

Die drei biologischen Replikate der CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen wurden unter denselben Bedingungen wie zuvor mit 0.5  $\mu$ M Sonde elektroporiert und vor der Messung mit PBS gewaschen. Es wurden jeweils 10 000 Zellen vermessen. Die Zelllinien wurden unabhängig voneinander elektroporiert, jedoch für den besseren Vergleich der Ergebnisse in der Abbildung 4.2.10 als Überlagerung dargestellt. Während der Auswertung wurden zunächst die toten Zellen mittels *gaten* ausgegrenzt (Anhang, Abbildung 9.2.10.1 und 9.2.10.3). Dafür musste die Hauptpopulation, bestehend aus lebenden Zellen, manuell eingekreist und die Zellen außerhalb dieses Bereichs ausgeschnitten werden. Eine Unterscheidung des Zellzustands war möglich, da bei der Beschädigung der Zellmembran die Granularität der Zellen steigt und gleichzeitig die Größe sinkt. Daher befinden sich die toten Zellen meist bei hohen SSC (*side scatter*)-Werten (hohe Streuung bedeutet hohe Granularität) und niedrigen FSC (*forwad scatter*)-Werten (geringe Streuung bedeutet geringe Größe). Anhand der Fluoreszenz im TO-Bereich der unbehandelten Zellen wurde die Hintergrundfluoreszenz festgelegt (Anhang, Abbildung 9.2.10.2 und Abbildung 9.2.10.4). Somit konnte eine Grenze zwischen dem Signal der TO-Sonden und dem der Zellen gesetzt werden. Die Einteilung in zwei Populationen (positiv und negativ) durch den Einsatz zweier Quadranten ist in Abbildung 4.2.10 A1 und A2 dargestellt. In der Cy7-TO-Darstellung wurden vier Quadranten eingesetzt (Abbildung 4.2.10 B1 und B2). Die restlichen Kombinationen sind im Anhang, Abbildung 9.2.10.1 bis 9.2.10.4 beigelegt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse in Abbildung 4.2.10 A1 lag die TO-Emission der **Jurkat-f-Cy7** in den Jurkat-Zellen (blau) sowie in den CCRF-CEM-Zellen (rot) über dem ermittelten Hintergrundsignal. Da die Hybridisierung der Sonden mit der Zielsequenz einen Anstieg der TO-Emission im Verhältnis zum Cy7-Signal initiieren müsste, wäre ein vermehrtes Aufkommen der Jurkat-Zellen im IV Quadranten zu erwarten. Bei den Zellen im IV Quadranten handelte es sich jedoch um ein starkes Gemisch beider Zellen, wobei dieses in Messung 1 und 2 vermehrt aus Jurkat-Zellen bestanden. Hier wäre zwar keine Selektion der reinen Zelllinie möglich gewesen, jedoch die einer Mischpopulation mit einem vermehrten Aufkommen der Jurkat-Zellen.

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden



**Abbildung 4.2.10** Auftragungen der Durchflusszytometer-Messungen von jeweils 10 000 Jurkat- und 10 000 CCRF-CEM-Zellen mit 0.5  $\mu$ M der jeweiligen TO-Cy7-Sonde. Durchgeführt wurden die Messungen an einem *BD Accuri™ C6*. Es wurden jeweils drei biologische Replikate ausgewertet.

Abbildung 4.2.10 A2 verdeutlicht, dass mit der **CCRF-CEM-a-Cy7** relativ wenige Zellen den Wert der Hintergrundfluoreszenz überschritten. Es wurde mit der Auftragung der TO- und Cy7-Emission ein deutlich vermehrtes Aufkommen der CCRF-CEM-Zellen im IV Quadranten erkennbar. Hier wäre eine Isolation der CCRF-CEM-Zellen durch den Einsatz einer komplementären Sonde möglich gewesen.

Anders als erwartet erreichte die Sonde mit der höheren Responsivität (**CCRF-CEM-a-Cy7**) eine erhöhte Fluoreszenz in den Messungen und nicht die Sonde mit der höheren Einzelstrangfluoreszenz (**Jurkat-f-Cy7**). Somit lag der Beweis vor, dass die Signalgebung spezifisch erfolgte und nicht wie im Fall der ersten FACS-Messung, durch Akkumulation der Sonden.

---

### 4.2.11 Diskussion

In den meisten Fällen erfolgt die Zellsortierung am FACS anhand zellphysikalischer Eigenschaften oder dem Einsatz von Antikörpern.<sup>[118]</sup> Diese Methoden sind in ihrer Anwendung durch den Mangel an ausreichend spezifischen Oberflächenproteinen sowie während der Phase der Zelldifferenzierung beschränkt.<sup>[119]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit konnten Zelllinien aus der Gruppe der T-Lymphozyten mit Hilfe von FIT-Sonden und der jeweils zellspezifischen komplementären TCR-mRNA unterschieden werden.

Ein Verdrängungsexperiment mit den Jurkat-Zellen, unter gleichzeitiger Verwendung einer zur TCR-mRNA komplementären TO-FIT- sowie Cy7-Sonde, zeigte eine um über 40% erniedrigte TO-Emission im Vergleich zu einer nicht-komplementären Cy7-Sonde.

Die Verwendung der Jurkat- und Molt-16-Zellen sowie zweier dazu komplementärer FIT-Sonden erlaubte die Unterscheidung beider Zelllinien durch die spezifische TO-Fluoreszenzemission. 50% der Molt-16-Zellen zeigten mit der **Molt-16-3-L** eine Fluoreszenzintensität größer als 8500. Diesen Wert erreichten lediglich 25% der Jurkat-Zellen. Beim Einsatz der **Jurkat-3-L** wiesen 75% der Jurkat-Zellen einen Wert größer als 12 000 auf. Diesen erreichten nur ca. 25% der Molt-16-Zellen. Dementsprechend konnten mithilfe der Sonden die dazu komplementären Zellen mehrheitlich markiert werden.

Die kovalente Bindung eines Referenzfarbstoffes (Cy7) an die TO-FIT-Sonden resultierte in einer verminderten TO-Emission im Einzelstrang sowie verbesserten Responsivität. Zudem konnte durch das simultane Messen der Cy7- sowie TO-Fluoreszenz ein Verhältnis der TO-Emission zur Gesamtmenge an Sonde erhalten werden. Die mit der **Jurkat-f-Cy7** markierten Zellen stellten zu 82% die Jurkat-Zellen dar. Die mit der **CCRF-CEM-a-Cy7** selektierten Zellen bestanden zu 87% aus CCRF-CEM-Zellen. Hierbei wäre bereits die Isolation einer Mischpopulation mit einem erhöhten Aufkommen einer Zelllinie am FACS möglich gewesen, sowie die Isolation der stark positiven Zellen mithilfe eines *Microscope Single Cell Isolator*.

In Arbeiten von Hubbell *et al.* wurden MBs zur Unterscheidung muriner embryonaler Stammzellen (mES) von Mitomycin-differenzierten embryonalen Fibroblasten (MEF), anhand der Transkription von Sox2, eingesetzt.<sup>[120]</sup> Die MBs wurden durch polymerbasierte Nanopartikel in die Zellen eingeführt. Hierbei war die Zielsequenz in den mES-Zellen, im Vergleich zu den MEFs-Zellen, um das 6000-fache gesteigert, was die Markierung durch die MBs erleichterte. In weiteren Arbeiten von Bao *et al.* konnten MBs zur Isolation von adhärenenten Kardiomyozyten aus einer Zellkultur von induzierten pluripotenten Stammzellen eingesetzt werden.<sup>[118a, 121]</sup> Die Sonden wurden durch

## 4.2 Zellmarkierung mit FIT-Sonden

---

Nukleofektion in die Zellen eingebracht. Die Sequenz war gegen die mRNA des Troponins-T- oder Myosins gerichtet, welche hauptsächlich in hohen Mengen (2 - 6-fach gesteigert) in den Kardiomyozyten exprimiert vorliegen. Hierbei fand jedoch nicht die Selektion verschiedener Zelllinien aus einer Mischpopulation statt, sondern lediglich die Selektion einer Zelllinie. Solch ein Ergebnis konnte bereits in Kapitel 4.2.10 mit den CCRF-CEM-Zellen am Durchflusszytometer erreicht werden. Im Gegensatz zu den Experimenten von Bao *et al.*, die lediglich eine Transfektionskontrolle in einem separaten Experiment anhand einer weiteren MB-Sonde beinhaltete, wurden in dieser Arbeit dual-markierte FIT-Sonden als konstante Transfektionskontrolle für jede Zelle bzw. jede Sonde eingebaut. Dieses Prinzip bietet eine verbesserte Genauigkeit der Ergebnisse, unabhängig der verwendeten Sonde. Durch eine Steigerung der Responsivität der FIT-Sonden sollte eine eindeutigere Unterscheidung der Zellen in Zukunft am FACS möglich sein.

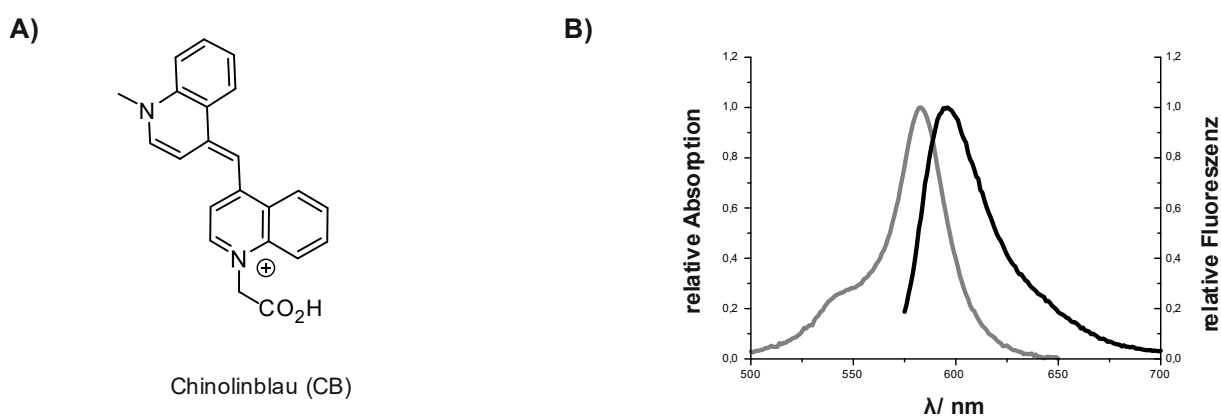


### 4.3 Verbesserte FIT-Sonden für zelluläre Anwendungen

Durch den Einsatz von FIT-Sonden in immer neu auftretenden biologischen Fragestellungen, besteht stetig der Bedarf die Sonden in ihren Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten weiterzuentwickeln. Das folgende Kapitel dient zur Übersicht der während dieser Arbeit durchgeführten Nebenprojekte und schließt zudem die in Kooperationen erarbeiteten Ergebnisse mit ein.

#### 4.3.1 Vasa-CB-FIT-Sonden

Für die zelluläre Anwendung von FIT-Sonden und die anschließende Auswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop sind klare Fluoreszenzsignale mit einem hohen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis notwendig.<sup>[53a, 122]</sup> In vorherigen Arbeiten von Hövelmann *et al.*<sup>[53a]</sup> erfolgte bereits die Untersuchung von Farbstoffen im rotverschobenen Bereich. Diese sollten helfen die Autofluoreszenz der Zellen zu umgehen und die Mehrfarben-Bildgebung durch die Kombination mehrerer Farbstoffe zu ermöglichen. Es zeigte sich, dass das 4'-4' verknüpfte Bischinolin (Chinolinblau, CB oder QB) mit einem Emissionsmaximum bei 605 nm, einen bis zu 195-fachen Fluoreszenzanstieg, bei ebenfalls hohen Quantenausbeuten von bis zu 0.47 lieferte (Abbildung 4.3.1.1).<sup>[8a]</sup>



**Abbildung 4.3.1.1** A) Struktur des Carboxymethyl-Chinolinblaus. B) Repräsentatives Absorptions- (grau) und Emissionsspektrum (schwarz) von Chinolinblau.

### 4.3 Verbesserte FIT-Sonden für zelluläre Anwendungen

Diese Arbeit konzentrierte sich, ergänzend zu den durch Hövelmann *et al.* hergestellten 2'-O-Me/LNA-Mixmer-Vasa-Sonden (**-Mix**), auf die Synthese von Sonden anderer Zusammensetzung. Die verwendete Zielsequenz (Vasa-mRNA) spielt dabei eine bedeutende Rolle in der embryonalen Entwicklung von Zebrafischembryonen (*Danio rerio*). Die hier herzustellenden Sonden stellten zum einen nukleaseresistente 2'-O-Me-Sonden ohne LNA-Monomer (**-O-L**) sowie Sonden aus ausschließlich DNA-Bausteinen (**-DNA**) dar.<sup>[53a]</sup> Nach der Synthese der Sonden folgte die Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens bei Hybridisierung mit komplementärer RNA. Die Vasa-DNA-Sonden wurden zusätzlich mit einer komplementären DNA-Zielsequenz vermessen (**+DNA**). Die Fluoreszenzintensitäten im Einzel- und Doppelstrang sowie die Steigerung der Fluoreszenz und Quantenausbeuten nach der Hybridisierung sind in Tabelle 4.3.1 dargestellt.

**Tabelle 4.3.1** Vasa-FIT-Sonden, vermessen mit RNA- oder DNA-Zielsequenz.

| Sonde                   | Sequenz  | $I_0$ | $I$ | $I/I_0$ | $\Phi/\Phi_0$ |
|-------------------------|--|-------|-----|---------|---------------|
| <b>Vasa-1-Mix</b>       | <u>UCUAUUUUCXT</u> <sub>L</sub> <u>CAUUUUUCA</u> | 0.8   | 154 | 195     | 112           |
| <b>Vasa-1-Mix-O-L</b>   | <u>UCUAUUUUCXT</u> <u>CAUUUUUCA</u>              | 0.5   | 35  | 65      | 25            |
| <b>Vasa-1-DNA</b>       | TCTATTTTCXTCATTTTCA                              | 1.0   | 11  | 11      | 6             |
| <b>Vasa-1-DNA + DNA</b> | TCTATTTTCXTCATTTTCA                              | 1.0   | 10  | 10      | 10            |
| <b>Vasa-2-Mix</b>       | <u>UCCAUUUUCXT</u> <sub>L</sub> <u>TAUUUUUCU</u> | 2.0   | 151 | 69      | 52            |
| <b>Vasa-2-Mix-O-L</b>   | <u>UCCAUUUUCXT</u> <u>TAUUUUUCU</u>              | 0.5   | 32  | 52      | 77            |
| <b>Vasa-2-DNA</b>       | TCCATTTTCXTTATTTTCT                              | 1.1   | 12  | 11      | 14            |
| <b>Vasa-2-DNA + DNA</b> | TCCATTTTCXTTATTTTCT                              | 1.1   | 12  | 11      | 20            |
| <b>Vasa-3-Mix</b>       | <u>GGCCGCCGUTXT</u> <sub>L</sub> <u>TCCUG</u>    | 1.1   | 158 | 125     | 67            |
| <b>Vasa-3-Mix-O-L</b>   | <u>GGCCGCCGUTXT</u> <u>TCCUG</u>                 | 0.8   | 36  | 42      | 45            |
| <b>Vasa-3-DNA</b>       | GGCCGCCGTTXTTCCTG                                | 2.7   | 82  | 30      | 34            |
| <b>Vasa-3-DNA + DNA</b> | GGCCGCCGTTXTTCCTG                                | 2.7   | 18  | 7       | 7             |
| <b>Vasa-4-Mix</b>       | <u>GGAACUACXT</u> <sub>L</sub> <u>GUUGGGC</u>    | 2.0   | 164 | 68      | 37            |
| <b>Vasa-4-Mix-O-L</b>   | <u>GGAACUACXT</u> <u>GUUGGGC</u>                 | 2.4   | 34  | 14      | 12            |
| <b>Vasa-4-DNA</b>       | GGAACUACXTGTTGGGC                                | 1.9   | 8   | 5       | 4             |
| <b>Vasa-4-DNA + DNA</b> | GGAACUACXTGTTGGGC                                | 1.9   | 8   | 5       | 9             |

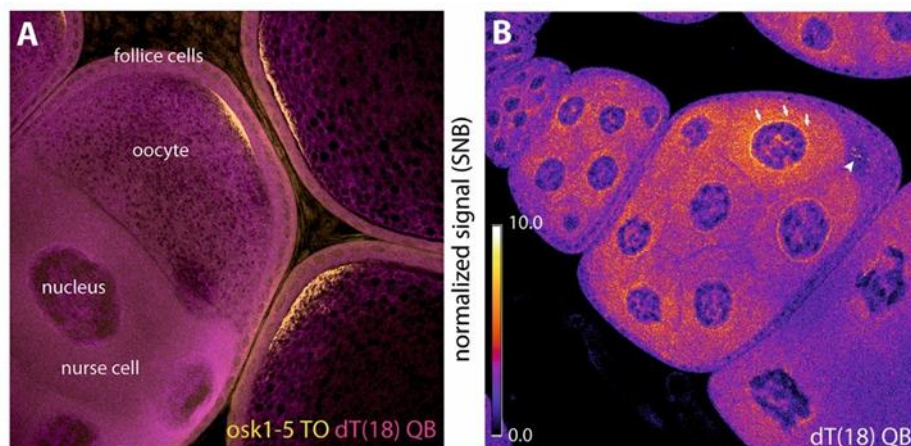
Unterstrichende Buchstaben sind 2'-O-Me-Nukleotide, tiefgestelltes „L“ steht für das LNA-Monomer, X steht für das CB-Monomer, Mix steht für die Mixmer-Sonden, O-L steht für die Mixmer-Sonden ohne LNA-Baustein, DNA steht für die Sonden ausschließlich bestehend aus DNA-Bausteinen.  $I_0$  = Fluoreszenzintensität im Einzelstrang,  $I$  = Fluoreszenzintensität im Doppelstrang,  $\Phi_0$  = Quantenausbeute im Einzelstrang,  $\Phi$  = Quantenausbeute im Doppelstrang. Wenn nicht anders angegeben (+DNA) wurden die Sonden mit RNA-Zielsequenz vermessen. Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. RNA- oder DNA-Zielsequenz in PBS bei 37°C. CB:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 560 nm und  $\lambda_{\text{em}}$  = 605 nm,  $\text{slit}_{\text{ex}}$  = 5 nm,  $\text{slit}_{\text{em}}$  = 5 nm.

Wie in Tabelle 4.3.1 zu erkennen, erreichten **Vasa-1-Mix** bis **Vasa-4-Mix** sehr hohe Fluoreszenzsteigerungen von bis zu  $I/I_0 = 195$ . Die Sonden ohne LNA-Monomer (**Vasa-1-Mix-O-L** bis **Vasa-4-Mix-O-L**) resultierten in einem 4-fach erniedrigten Anstieg der Fluoreszenz.

### 4.3 Verbesserte FIT-Sonden für zelluläre Anwendungen

Der Grund hierfür liegt im LNA-Effekt, der zu einer lokalen Verfestigung der Duplexstruktur führt.<sup>[8a]</sup> Zusätzlich war anzumerken, dass die Fluoreszenzanstiege der CB-Sonden selbst ohne LNA-Monomer höher lagen, als die der TO-Sonden mit LNA-Baustein.<sup>[53a]</sup> Ein Unterschied der CB-Emission nach Hybridisierung mit der RNA- oder DNA-Zielsequenz blieb dagegen aus.<sup>[53a]</sup> Einzig die **Vasa-3-DNA** zeigte eine erhöhte Responsivität nach Hybridisierung mit der RNA-Zielsequenz. Die Werte der Quantenausbeuten spiegelten ein ähnliches Verhalten wider. Eine Ausnahme bildete die **Vasa-2-Mix-O-L**.

Nach der *in vitro* Analyse von Responsivität und Helligkeit der CB-Sonden folgte der Einsatz auf zellulärer Ebene. In Zusammenarbeit mit Dr. Gaspar aus der Arbeitsgruppe von Dr. Ephrussi (EMBL, Heidelberg) wurden fixierte *Drosophila* Eierkammern verwendet um den poly-A-Schwanz der mRNA mit **poly-dT-CB**-Sonden (TTTTTTTT(CB)-T<sub>L</sub>TTTTTTTT) zu markieren (Abbildung 4.3.1.2). *In vitro* zeigte die **poly-dT-CB**-Sonde einen 89-fach erhöhten Fluoreszenzanstieg nach Hybridisierung. Durch die bereits etablierte waschfreie FISH-Methode war es möglich die Emission der Sonden, ohne einen zusätzlichen Waschschrift, nach der Inkubation am Mikroskop zu visualisieren.<sup>[107]</sup> Zum Vergleich wurden fünf **Oskar-mRNA-TO**-Sonden eingesetzt, die stark in den Eikammern der Oozyten akkumulierten (Abbildung 4.1.1.2 A). Die hier erstmalig eingesetzte **poly-dT-CB** zeigte eine kontrastreiche, weitgehend homogene Verteilung, mit verstärkter Akkumulation am Pol der Zellen und um den Zellkern der *nurse cell* (Abbildung 4.3.1.2 B).



**Abbildung 4.3.1.2** Fixierte *Drosophila Melanogaster* Eierkammern markiert mit fünf TO-*Oskar*-mRNA-Sonden (0.1 M) und einer **poly-dT-CB**-Sonde (0.5 M) durch waschfreie FISH.<sup>[8]</sup> Die Aufnahmen wurden mit einem *Leica SP8 TCS* unter Verwendung eines 63x1.4 NA Ölobjektiv durchgeführt. TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 525 - 575 \text{ nm}$  und CB:  $\lambda_{\text{ex}} = 592 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 605 - 650 \text{ nm}$ .

---

### 4.3.2 CB-FIT-Sonde als spezifischer Influenza A-Marker

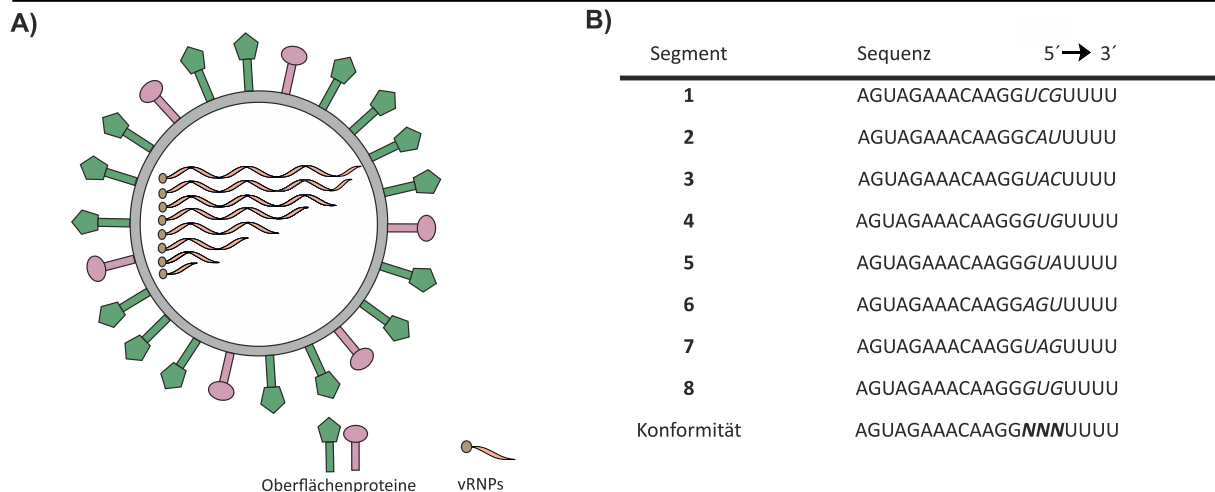
#### 4.3.2.1 CB-FIT-Sonden für die FISH-Anwendung

In Zusammenarbeit mit Haralampiev *et al.* aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Herrmann (HU Berlin) wurde der zeitliche Verlauf eines viralen Infektionszyklus des Influenza Virus (IV) A/H3N2 (Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N)) mit einer CB-FIT-Sonde untersucht. Die dazugehörigen biologischen Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Herrmann durchgeführt.

In Abbildung 4.3.2.1 A ist der schematische Aufbau eines Virus dargestellt.<sup>[5, 123]</sup> Während eines Infektionszyklus gelangt der Influenza A Virus über Endozytose in die Wirtszelle und setzt zunächst die vRNP frei. Diese werden anschließend für die Transkription in den Zellkern transportiert. Die virale RNA (vRNA) wird dort im frühen Stadium in virale *messenger* RNA (vmRNA) umgeschrieben. Die Translation zu den viralen Proteinen findet anschließend im Zytosol statt (*pre-switch state*). Der Übergang von vmRNA Transkription zu vRNA Replikation wird durch die *small* virale RNA (svRNA) und eine daraus resultierende allosterische Modifikation der Polymerase-Untereinheit PA eingeleitet (*switch state*). In diesem Zusammenhang bilden die vRNA zusammen mit den Nukleoproteinen (NP) und der Polymerase neue vRNP. Diese neuen vRNP können anschließend an der Membran neue Viren formen und durch die Exozytose angrenzende Zellen infizieren (*post-switch state*).

Insgesamt liegen um die 100 000 Kopien von svRNA pro Zelle vor, welche identisch mit den 5'-Enden der vRNA sind. Sowohl durch ihr hohes Sequenzaufkommen als auch durch ihr spezifisches Auftreten beim Übergang der vmRNA-Transkription zur vRNA-Replikation, ist die Sequenz zur Markierung durch einen panspezifischen Sensor geeignet.<sup>[124]</sup> Durch eine zuvor durchgeführte BLAST-Analyse wurden die vRNA-Sequenzen mit dem humanen Genom abgeglichen. Dadurch sollte das Auftreten falsch-positiver Signale durch partielle Hybridisierung mit den Sonden verhindert werden. Die geringsten Überschneidungen ergaben sich dabei mit dem Segment 1 (Abbildung 4.3.2.1 B).

### 4.3 Verbesserte FIT-Sonden für zelluläre Anwendungen

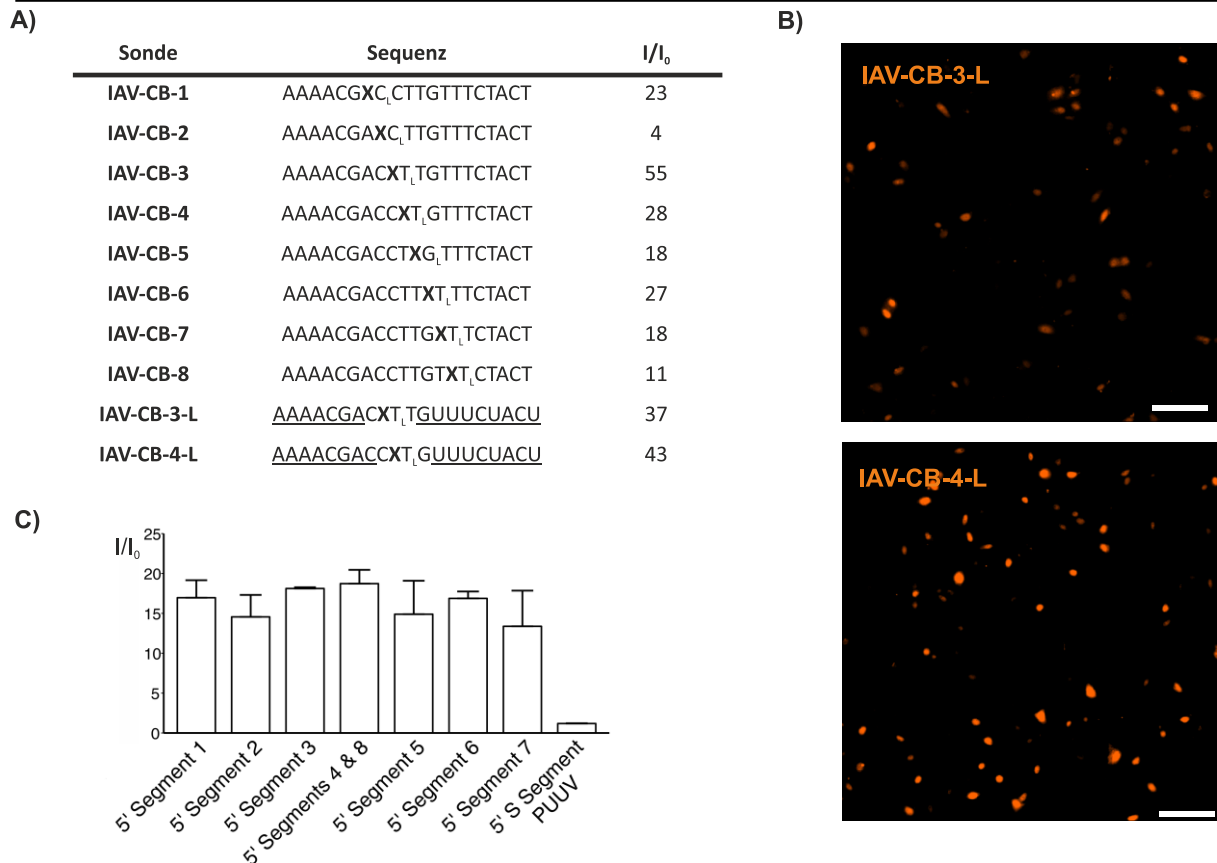


**Abbildung 4.3.2.1** A) Schematische Darstellung eines IA Virus mit den Oberflächenproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase und den acht verschiedenen viralen Ribonukleoproteinen (vRNP). B) Tabelle mit den 5'Enden der acht vRNA-Sequenzen (Segment 1 bis Segment 8), N = variable Base.

In der Masterarbeit von Jonas Steffen wurde eine CB-Positionsrastrung auf Basis des Segments 1 durchgeführt. Die Integration des Farbstoffes fand jeweils in acht verschiedenen Positionen der Sequenz statt. Nebenstehend zur 3'-Position wurde die jeweilige LNA zur Steigerung der Helligkeit eingebaut.<sup>[8a]</sup> Die Tabelle in Abbildung 4.3.2.2 A zeigt die verschiedenen Sequenzen mit den dazugehörigen Fluoreszenzsteigerungen.<sup>[125]</sup> **IAV-CB-3** und **IAV-CB-4** mit  $I/I_0 = 55$  und  $I/I_0 = 28$  erreichten die höchsten Fluoreszenzanstiege. Beide Sequenzen wurden infolgedessen, in der hier vorliegenden Arbeit, als nukleaseresistente Mixmer-Sonden hergestellt und vermessen. Die **IAV-CB-3-L** erreichte einen kleineren Fluoreszenzanstieg als die **IAV-CB-4-L**. Die Helligkeit im Doppelstrang lag jedoch mit  $Br_{ds} = 17$  etwas höher als mit  $Br_{ds} = 16$  (Anhang, Tabelle 9.3.2.1).

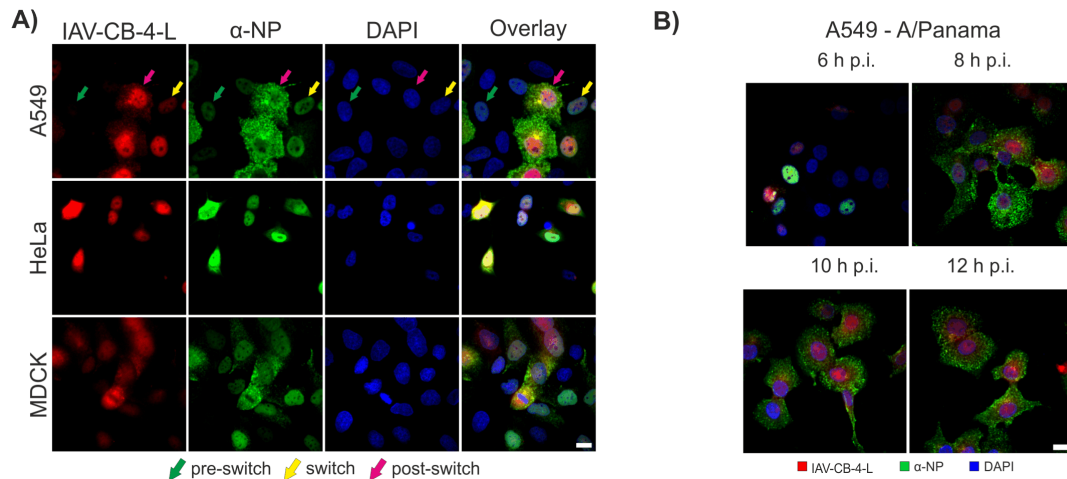
Beide Sonden wurden durch FISH in einer Konzentration von 100 nM vermessen (Abbildung 4.3.2.2 B). Die **IAV-CB-4-L** schien aufgrund des helleren Fluoreszenzbildes mit einem größeren Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis besser geeignet. Zur Überprüfung der Spezifität der Sonde wurde die **IAV-CB-4-L** mit den verschiedenen Segmenten des IAV *in vitro* vermessen (Abbildung 4.3.2.2 C). Die Zugabe der IAV-Segmente führte in allen Fällen zu einem Anstieg der Fluoreszenz. Somit konnte trotz einiger Basenfehlpaarungen in der Sequenz, eine ausreichende Basenpaarung um den Farbstoff erreicht werden. Bei der Zugabe einer RNA-Sequenz des Virustypen PUUV blieb ein Fluoreszenzanstieg aus (Abbildung 4.3.2.2. C).

### 4.3 Verbesserte FIT-Sonden für zelluläre Anwendungen



**Abbildung 4.3.2.2** A) Tabelle der DNA- und Mixmer-Sonden und die dazugehörigen Fluoreszenzsteigerungen. Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37°C. CB:  $\lambda_{\text{ex}} = 560$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 605$  nm,  $\text{slit}_{\text{ex}} = 5$  nm,  $\text{slit}_{\text{em}} = 5$  nm. B) Fluoreszenzbilder von A549-Zellen (9 h Infektion) nach FISH mit **IAV-CB-3-L** und **IAV-CB-4-L**. Die Messungen wurden an einem *Visitron VisiScope Scanning Disk* konfokalem Laser-Mikroskop durchgeführt. Sondenkonzentration: 100 nM, CB:  $\lambda_{\text{ex}} = 525/50$  nm und  $\lambda_{\text{em}} = 600 - 650$  nm. C) Balkendiagramm mit den Fluoreszenzanstiegen nach Hybridisierung der **IAV-CB-4-L** mit den verschiedenen Segmenten des IA Virus sowie dem PUUV-Virus. Bedingungen: 0.1  $\mu$ M **IAV-CB-4-L** mit 5 Äq. Zielsequenz in PBS bei 37 °C. Die Skala beträgt 100  $\mu$ m.

Die nachfolgenden FISH-Experimente wurden mit einer nukleaseresistenten Mixmer-Sonde durchgeführt, um eine stärkere Hybridisierung mit der Zielsequenz und erhöhte Schmelztemperatur sicherzustellen. Dies verhinderte das Entfernen der FIT-Sonden während der Waschschrte. Für die Zelleexperimente mussten zunächst A549-, HeLa- und MDCK-Zellen über 8 - 10 h mit dem Panama A Virus infiziert, anschließend mit *p*-Formaldehyd fixiert und mit 70% Ethanol permeabilisiert werden. Nach der svRNA-Markierung mit der **IAV-CB-4-L** folgte die Zellkernfärbung mit DAPI (Abbildung 4.3.2.3 A). Zur Überprüfung der Signal-Spezifität der **IAV-CB-4-L** diente zusätzlich ein kommerziell erhältlicher Antikörper gegen die Nukleoproteine ( $\alpha$ -NP-TRITC). Die Fluoreszenzbilder bestätigten eine Korrelation der positiven Antikörperfärbung und des FIT-Sonden-Signals innerhalb der Zellen. Sofern keine Antikörperfärbung ersichtlich war, stellte sich auch das Fluoreszenzsignal der Sonde als sehr gering dar. Zur Aufklärung und Darstellung der unterschiedlichen Stadien dienen farbige Pfeile in der Abbildung 4.3.2.3 A.



**Abbildung 4.3.2.3** A) A549-, MDCK- und HeLa-Zellen wurden über 8 - 10 h mit Panama A infiziert. Die Proben wurden fixiert und anschließend mittel FISH und **IAV-CB-4-L** (rot), α-NP (grün) und DAPI (blau) angefärbt. Bei allen mit NP markierten Zellen konnte ein FIT-Sonden-Signal beobachtet werden. Die farbigen Pfeile zeigen die verschiedenen Infektionsstadien des Virus: *pre-switch* (grün), *switch* (gelb) und *post-switch* (violett).<sup>[5]</sup> B) Zeitlicher Verlauf der Infektionsstadien in infizierten A549-Zellen. Die Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und anschließend mit der **IAV-CB-4-L** (rot), α-NP (grün), und DAPI (blau) angefärbt. Bei den Bildern handelt es sich um überlagerte Fluoreszenzbilder. Die Skala beträgt 10 µm.

Zu Beginn der Infektion war kein Anfärben mit den CB-FIT-Sonden möglich. Daraus ließ sich schließen, dass weder vRNA noch svRNA vorlagen (grüner Pfeil). Dieses Stadium wird als *pre-switch* bezeichnet, in dem lediglich die NP gebildet und in den Zellkern transportiert werden. Dies erklärte die leichte Antikörperfärbung im Zellkern. Zellen, die sowohl ein CB- als auch Antikörper-Signal im Zellkern aufzeigen, deuten auf die Produktion der vRNA und svRNA hin. Wenn jedoch kein Signal im Zytosol zu erkennen ist, bleibt zu diesem Zeitpunkt die vRNP-Bildung aus. Dieses Stadium wird als *switch* bezeichnet und ist in Abbildung 4.3.2.3 A mit einem gelben Pfeil markiert. Zellen, die ein CB-Signal im Zellkern und im Zytosol aufzeigen, befinden sich im *post-switch* (violetter Pfeil). Diese Zellen bilden bereits neue vRNP, die anschließend die nebenliegenden Zellen infizieren können.

In Abbildung 4.3.2.3 B sind die Fluoreszenzbilder der Zellen über eine Dauer von 12 h dargestellt. Mithilfe der Lokalisation der CB-Emission war es möglich das jeweilige Stadium der Infektion in den Zellen zu erkennen. Um die Spezifität der Sonden zu bestätigen wurden in weiterführenden Experimenten A549-Zellen mit 11 verschiedenen Influenza A Viren und einem Influenza B Virus (B/Lee) infiziert. In allen Fällen der IA Infektion konnte ein Signal der CB-Sonden beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Sonde bei Zellen mit einem Influenza B Virus kein CB-Signal (Anhang, Abbildung 9.3.2.2). Zusammenfassend konnten CB-FIT-Sonden als panspezifischer Sensor zur Markierung von Influenza A Viren, bzw. zur Darstellung des Infektionsverlaufs innerhalb der Zellen genutzt werden.

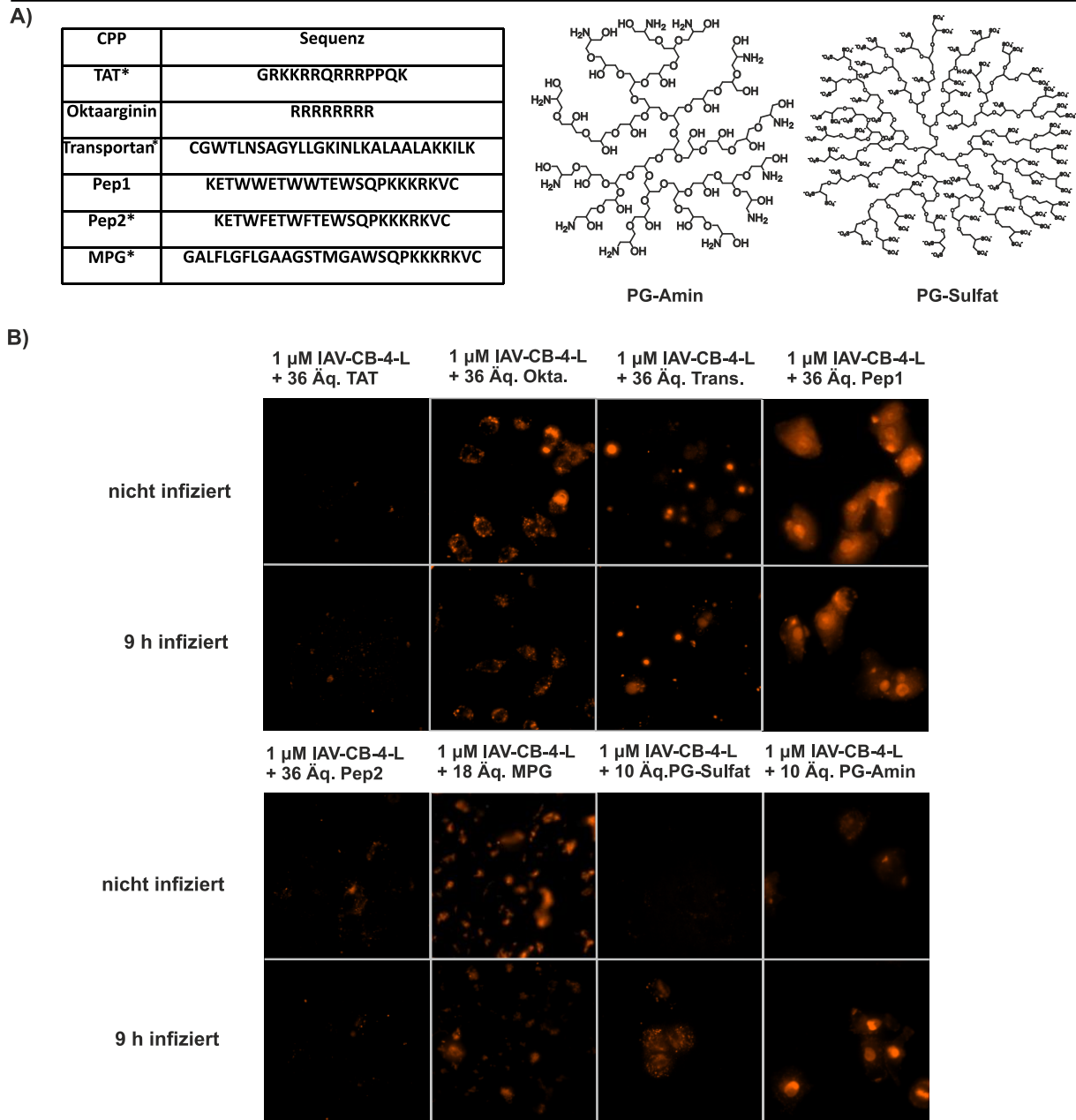
---

### 4.3.2.2 IAV-CB-Sonden für die Anwendung in lebenden Zellen

Durch die bereits bestehende Zusammenarbeit mit Dr. Haralampiev sollte die verwendete CB-FIT-Sonde anschließend zur Untersuchung der Transfektion in lebende A549-Zellen eingesetzt werden. Dafür wurde die Sonde mit verschiedenen zellpenetrierenden Peptiden (TAT, Oktaarginin, Transportan, Pep1, Pep2 und MPG) sowie zwei Polyglycerol-Agentien (Polyglycerol-Amin und Polyglycerol-Sulfat)<sup>[99]</sup> aus der Arbeitsgruppe Haag aggregiert (Abbildung 4.3.2.4 A).<sup>[99]</sup> Die Zellen wurden mit den Aggregaten über 90 min in PBS inkubiert, mit PBS gewaschen und in phenolrotfreiem DMEM mikroskopiert. Die Fluoreszenzbilder sind in Abbildung 4.3.2.4 dargestellt. Der Vergleich der hier vorliegenden Fluoreszenzbilder zeigt, dass mithilfe von TAT und Pep2 kein Sondenimport in die Zellen gelang. Es waren lediglich geringe Signale der Sonde zu erkennen. Oktaarginin, Transportan und MPG erzielten dagegen eine bessere Aufnahme der Sonden ins Zytosol. Allerdings erschwerte die Bildung großer Aggregatstrukturen die bildgebende Analyse. Zudem blieb trotz der Infektion der Zellen ein Anstieg der TO-Emission aus. Dies lässt schlussfolgern, dass die zu erkennenden Signale nicht aus der Hybridisierung mit der Zielsequenz resultierten. Pep1, welches sich durch einzelne Aminosäuren in der Zusammensetzung zu Pep2 leicht unterscheidet, zeigte eine erhöhte Effizienz der Membrandurchdringung. Die homogene Verteilung des Fluoreszenzsignals innerhalb der Zellen deutete zudem auf freie Sonde im Zytosol und im Zellkern hin. Folglich sollte eine Hybridisierung mit der Zielsequenz möglich sein. Bei genauerer Betrachtung war jedoch kein Intensitätsunterschied bei An- bzw. Abwesenheit der svRNA zu erkennen. Das PG-Sulfat erzielte einen ausreichenden Transport der Sonde sowie Lokalisation dieser im Zytosol der Zellen. Die Steigerung der Fluoreszenzintensität, bei Vorhandensein der Zielsequenz, war klar vorhanden. Gleiches konnte mit dem PG-Amin beobachtet werden. Hier war zudem ein deutlicheres und homogenes Signal der Fluoreszenz ersichtlich. Ein klarer Unterschied von Ab- und Anwesenheit der svRNA war zu erkennen.



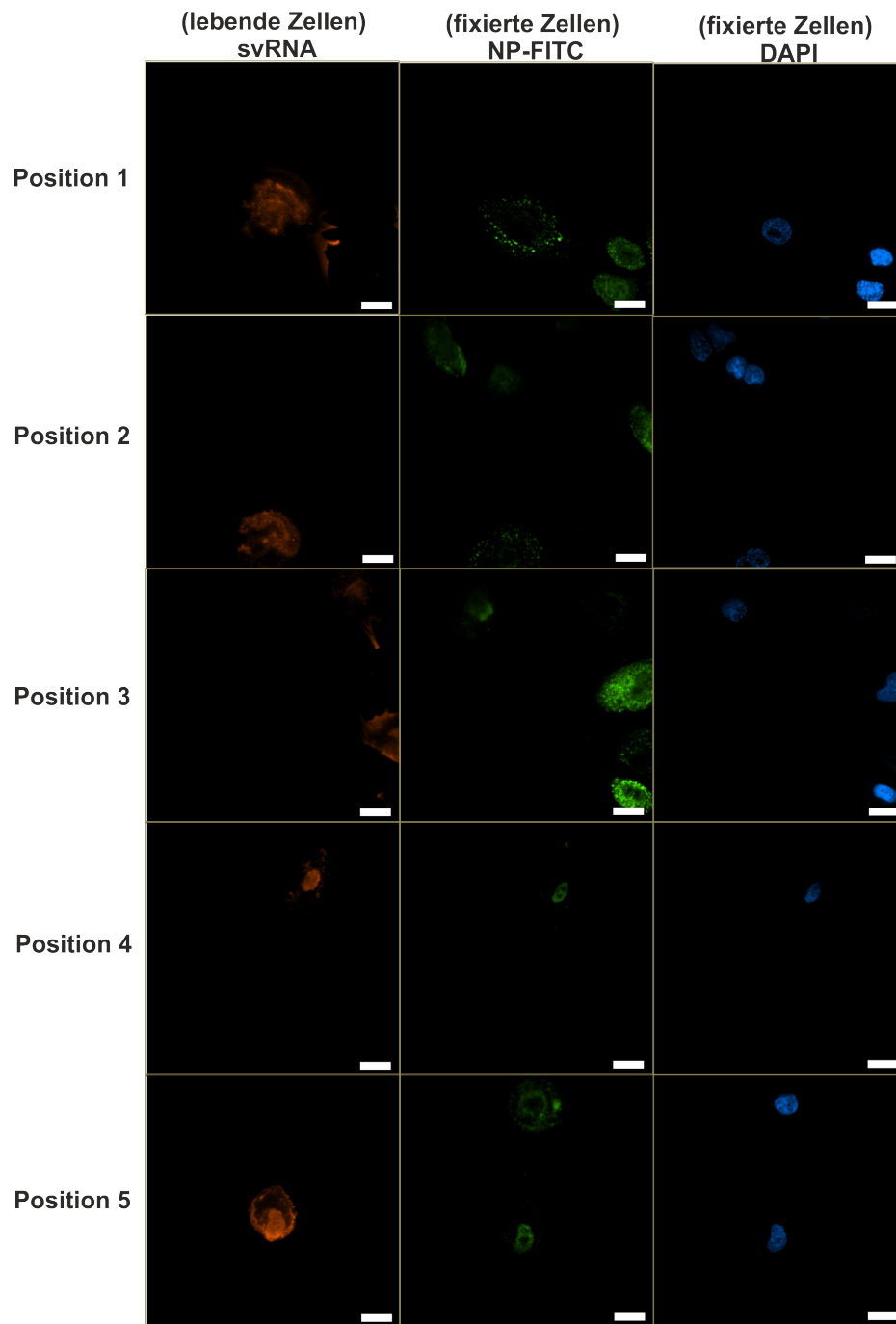
### 4.3 Verbesserte FIT-Sonden für zelluläre Anwendungen



**Abbildung 4.3.2.4** A) Links: Tabelle mit den verwendeten Peptiden und deren Sequenzen. \* = Sequenz ist terminal durch ein Cystein oder Lysin für die kovalente Verwendung modifiziert und weicht somit von der Originalsequenz ab. Rechts: Chemische Struktur des Polyglycerol-Amins und des Polyglycerol-Sulfats. B) Fluoreszenzbilder der A549-Zellen nach Transfektion mit **IAV-CB-4-L** durch Inkubation mit Peptiden und Polyglycerol-Carriern. Die Inkubation erfolgte 90 min in PBS bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Die anschließende Mikroskopie wurde in phenolrotfreiem DMEM bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> an einem inversen konfokalem *Laser-Scanning* Mikroskop der Firma *Visitron VisiScope* durchgeführt. Die Skala beträgt 10  $\mu$ m.

Da ausschließlich das PG-Amin vielversprechende Ergebnisse lieferte, sollte die Methode im Folgenden optimiert werden. Dementsprechend wurde versucht die Hintergrundfluoreszenz durch eine kürzere Inkubationszeit von 30 min und eine geringere Sondenkonzentration von 0.25  $\mu$ M abzusenken. Zusätzlich sollte die Lokalisation der Sonden durch den Einsatz eines Antikörpers und deren Kolokalisation überprüft werden. In Abbildung 4.3.2.5 sind die Fluoreszenzbilder der Zelleexperimente gezeigt.

#### 4.3 Verbesserte FIT-Sonden für zelluläre Anwendungen



**Abbildung 4.3.2.5** Fluoreszenzbilder verschiedener A549-Zellen nach der Inkubation mit 0.25  $\mu\text{M}$  **IAV-CB-4-L** und 2.5  $\mu\text{M}$  PG-Amin für 30 min in PBS bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$ . Es erfolgte die anschließende Fixierung mit *p*-Formaldehyd sowie das Anfärben mit NP-FITC und DAPI durch FISH.

Mehrere A549-Zellen wurden zunächst nach der Inkubation über 30 min mit 0.25  $\mu\text{M}$  **IAV-CB-4-L** und 2.5  $\mu\text{M}$  PG-Amin in PBS bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  am Mikroskop aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit *p*-Formaldehyd fixiert sowie durch  $\alpha$ -NP-FITC-Antikörper und DAPI angefärbt (Abbildung 4.3.2.5). In allen durch die Sonden markierten Bereiche, rührte das Fluoreszenzsignal von der spezifischen Hybridisierung der FIT-Sonden mit der svRNA her. Die Signale konnten in Form einer Kolokalisation mit den  $\alpha$ -NP-Signalen bekräftigt werden. Dennoch lagen vereinzelt Zellen vor, die durch das PG-Amin nicht durchdrungen wurden und somit keine

Sonde enthielten. Insgesamt konnte in diesem Experiment eine Transfektionseffizienz von 40%, mit spezifischen Signalen der FIT-Sonden in den Zellen, erreicht werden. Die Transfektionsmethode wäre somit für die Lebendzell-Bildgebung von FIT-Sonden in A549-Zellen denkbar und belegt, dass FIT-Sonden ebenfalls mithilfe von Polyglycerolen erfolgreich in lebende Zellen eingebracht werden können.

#### 4.3.3 Synthese neuer Farbstoffe

Es folgte die Untersuchung neuer Farbstoffe im grünen Wellenlängenbereich. Diese sollten eine erhöhte Responsivität und Helligkeit im Vergleich zum Thiazolorange aufweisen, um die Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen zu erleichtern. Es wurden zwei bereits von Bohländer *et al.* hergestellte Cyanin-Styryl-Chromophore auf das FIT-Sonden-Konzept übertragen.<sup>[126]</sup> Beide zeigten in vorherigen Experimenten, durch die Aggregation mit DNA, einen 34 - 39-fachen Fluoreszenzanstieg. Abbildung 4.3.3.1 gibt die Syntheseroute der beiden Farbstoffe für den Einbau in FIT-Sonden wieder.

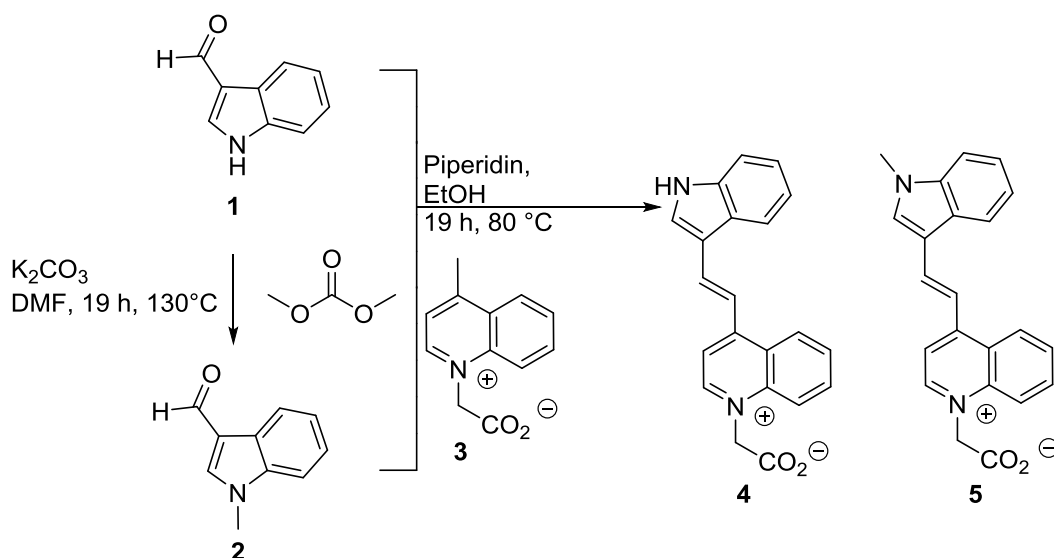


Abbildung 4.3.3.1 Schematische Darstellung der Syntheseroute von Rot (4) und Methylrot (5).

Für den Einsatz in FIT-Sonden musste der Farbstoff Rot (4) und Methylrot (5) in einer leicht abgeänderten Syntheseroute zu Bohländer *et al.*, über eine nukleophile Substitution von kommerziell erhältlichen Indol-3-carboxaldehyd mit carboxymethyliertem Lepidin, hergestellt werden. Für das Methylrot (5) war eine zusätzliche Methylierung des Indol-3-carboxaldehyd (1) mit Dimethylcarbonat und der anschließenden Verknüpfung mit dem zuvor hergestellten N-(Carboxymethyl)-4-methylchinolin (3) notwendig.<sup>[90]</sup> Der Einbau der Farbstoffe in die FIT-



### 4.3 Verbesserte FIT-Sonden für zelluläre Anwendungen

**Tabelle 4.3.3** Test-Sonden mit unterschiedlichen Farbstoffen.

| Sonde     | Sequenz                            | $I_0$ | $I$ | $I/I_0$ |
|-----------|------------------------------------|-------|-----|---------|
| Test-1-BO | AAATGCTCTXT <sub>L</sub> GTTACTACT | 53    | 112 | 2       |
| Test-1-TO |                                    | 45    | 227 | 5       |
| Test-1-CV |                                    | 1.7   | 23  | 14      |
| Test-1-MR |                                    | 47    | 50  | 1.1     |
| Test-1-R  |                                    | 14    | 7   | 0.5     |
| Test-2-BO | AAATGCTCTTTXT <sub>L</sub> TACTACT | 43    | 114 | 2.6     |
| Test-2-TO |                                    | 49    | 197 | 4       |
| Test-2-CV |                                    | 6.7   | 58  | 8.6     |
| Test-2-MR |                                    | 67    | 47  | 0.7     |
| Test-2-R  |                                    | 7     | 4   | 0.6     |
| Test-3-BO | AAATGCTXT <sub>L</sub> TTGTTACTACT | 50    | 166 | 3.3     |
| Test-3-TO |                                    | 49    | 223 | 4.5     |
| Test-3-CV |                                    | 2.7   | 53  | 19      |
| Test-3-MR |                                    | 43    | 38  | 0.88    |
| Test-3-R  |                                    | 7     | 3   | 0.2     |
| Test-4-BO | AAAATCTCCXT <sub>L</sub> GCTACTGCT | 38    | 135 | 3.5     |
| Test-4-TO |                                    | 24    | 192 | 8       |
| Test-4-CV |                                    | 3.7   | 61  | 16      |
| Test-4-MR |                                    | 44    | 6.6 | 0.1     |
| Test-4-R  |                                    | 3     | 0.7 | 0.2     |
| Test-5-BO | AAAATCTCCTTGXT <sub>L</sub> ACTGCT | 72    | 284 | 3.9     |
| Test-5-TO |                                    | 102   | 336 | 3.3     |
| Test-5-CV |                                    | 6.8   | 56  | 8       |
| Test-5-MR |                                    | 4.7   | 16  | 3.4     |
| Test-5-R  |                                    | 1.5   | 2.2 | 1.5     |
| Test-6-BO | AAAATCTCCTTGCTAXT <sub>L</sub> GCT | 30    | 151 | 5       |
| Test-6-TO |                                    | 18    | 189 | 10      |
| Test-6-CV |                                    | 2.6   | 32  | 12      |
| Test-6-MR |                                    | 39    | 72  | 1.8     |
| Test-6-R  |                                    | 4.7   | 6   | 1.22    |

Tiefgestelltes „L“ steht für das LNA-Monomer, X steht für den jeweiligen Farbstoff. Fluoreszenzintensität im Einzelstrang =  $I_0$ , Fluoreszenzintensität im Doppelstrang =  $I$  und die Fluoreszenzsteigerung =  $I/I_0$ . Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7) bei 25 °C. BO:  $\lambda_{ex}$  = 440 nm,  $\lambda_{em}$  = 485 nm, TO:  $\lambda_{ex}$  = 485 nm,  $\lambda_{em}$  = 535 nm, CV:  $\lambda_{ex}$  = 530 nm,  $\lambda_{em}$  = 570 nm, Methylrot:  $\lambda_{ex}$  = 494 nm,  $\lambda_{em}$  = 596 nm, Rot:  $\lambda_{ex}$  = 480 nm,  $\lambda_{em}$  = 590 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

BO, TO und MR zeigten die höchsten Fluoreszenzintensitäten im Einzelstrang. Die Werte lagen im zwei- bis dreistelligem Bereich. Die geringste Einzelstrangfluoreszenz erzielten CV und R, mit vorwiegend Werten im einstelligen Bereich. Die BO- sowie TO-Sonden erreichten zudem sehr hohe Fluoreszenzintensitäten im Doppelstrang, wobei die TO-Sonde in einem bis zu 10-fachen Anstieg der Fluoreszenz resultierte. Somit waren die Fluoreszenzsteigerungen vom TO, im Vergleich zum BO, doppelt so hoch. Obwohl die CV-Sonden eine relativ geringe Fluoreszenz im Doppelstrang erreichten, resultierte durch die geringe Einzelstrangfluoreszenz ein erhöhter Anstieg. Der CV-Farbstoff erzielte Werte von  $I/I_0 = 12 - 19$ , die doppelt so hoch waren, wie die des TO. Demzufolge wäre der Farbstoff für die Mehrfachmarkierung in Mixmer-Sonden geeignet, da die Anreicherung mehrerer Farbstoffe in diesem Fall eine höhere Gesamtintensität bewirken konnte. Die neuen Farbstoffe R und MR zeigten keine nennenswerten Fluoreszenzanstiege. Rot erreichte in vier von sechs Fällen sogar einen Abfall in der Fluoreszenzemission nach Hybridisierung. Methylrot zeigte, abgesehen von einem Anstieg von  $I/I_0 = 3.4$ , keine signifikanten Veränderungen. Die neuen Farbstoffe waren somit weder hell noch responsiv und demzufolge nicht für die Verwendung in FIT-Sonden geeignet. Der CV-Farbstoff war hingegen in der Kombination mit einem LNA-Baustein für die Mehrfachmarkierung in FIT-Sonden vielversprechend.

#### 4.3.4 Einbau eines Tcyp-PNA-Monomers in TO-PNA-FIT-Sonden

Da bei der Optimierung der FIT-Sonden die Helligkeit von großer Wichtigkeit ist wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Simon Bartsch ein zyklisches Monomer zur Verbesserung der Responsivität sowie Helligkeit von TO-PNA-FIT-Sonden untersucht. Das von Appella *et al.* entwickelte zyklische trans-Cyclopentan (Tcyp)-PNA-Monomer wurde für die Analysen ausgewählt. Das PNA-Monomer führt zu einer erhöhten Duplexstabilität mit einer DNA- sowie RNA-Zielsequenz. Die sterisch anspruchsvolle zyklische Struktur des Monomers könnte folglich zu einer erhöhten Fluoreszenzemission führen. Dieser Effekt wäre analog zum LNA-Effekt in DNA-FIT-Sonden.<sup>[91b]</sup> Abbildung 4.3.4.1 zeigt die Strukturformeln des üblich verwendeten PNA-Rückgrats und des zyklischen Tcyp-Monomers. Die genaue Synthese-Route ist in der Bachelorarbeit von Simon Bartsch erläutert.<sup>[127]</sup>

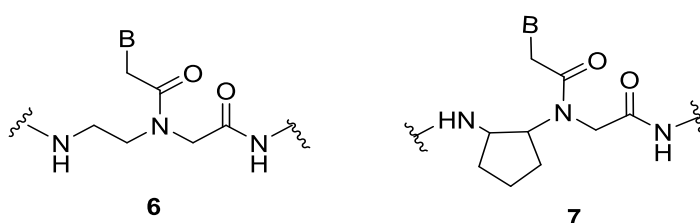


Abbildung 4.3.4.1 Strukturformel des Aeg-PNA-Rückgrats (6) und des Tcyp-PNA-Rückgrats (7).

Um den Einfluss des Tcyp-Monomers auf die TO-Fluoreszenzeigenschaften zu untersuchen wurden PNA-FIT-Sonden herangezogen, die von Socher *et. al* für das Imaging von mRNA des Influenzavirus H1N1 verwendet wurden. Fünf der ursprünglich acht Sonden enthielten ein Thiazolorange in direkter Nachbarschaft zum Thymin. Durch die Synthese eines Tcyp-T-Monomers konnten folglich fünf Sonden mit geringem synthetischen Aufwand hergestellt werden. Tabelle 4.3.4.1 zeigt die untersuchten Sequenzen.

Tabelle 4.3.4.1 Sequenzen der hergestellten Tcyp-TO-PNA-Sonden.

| Sonde         | Sequenz   |
|---------------|---|
| Tcyp-TO-PNA-1 | H <sub>2</sub> N-Lys-c a g t t * Aeg(TO) t t a t g c c g t t g-Lys-NH <sub>2</sub>  |
| Tcyp-TO-PNA-2 | H <sub>2</sub> N-Lys-c a g t t a Aeg(TO) t * a t g c c g t t g- Lys-NH <sub>2</sub> |
| Tcyp-TO-PNA-3 | H <sub>2</sub> N-Lys-c a g t t a t * Aeg(TO) a t g c c g t t g- Lys-NH <sub>2</sub> |
| Tcyp-TO-PNA-4 | H <sub>2</sub> N-Lys-c a g t t a t t Aeg(TO) t * g c c g t t g- Lys-NH <sub>2</sub> |
| Tcyp-TO-PNA-5 | H <sub>2</sub> N-Lys-c a g t t a t t a t * Aeg(TO) c c g t t g- Lys-NH <sub>2</sub> |

\*= tcyp-Thymin-Monomer.

### 4.3 Verbesserte FIT-Sonden für zelluläre Anwendungen

Zur Verbesserung der Löslichkeit dienten terminale Lysine, welche bereits in den Influenza H1N1-PNA-Sonden Verwendung fanden. Die Sonden wurden unter denselben Bedingungen wie die Vergleichssonden vermessen. Der Vergleich der Tcyp-Sonden mit den Vergleichssonden ergab eine ca. 6-fach erhöhte Fluoreszenzintensität der Tcyp-Sonden im Einzelstrang (Tabelle 4.3.4.2). Die Rotation des Farbstoffes schien bereits im Einzelstrang, durch das zyklische Monomer, stark gehindert, so dass bereits hier hohe Quantenausbeuten erreicht wurden. In vier von fünf Fällen lag die Intensität des Thiazolorange im Doppelstrang höher als in den unmodifizierten Sonden.<sup>[25]</sup> Durch die bereits erhöhte Einzelstrangfluoreszenz verschlechterte sich jedoch die Responsivität. Somit konnte eine Verbesserung der Helligkeit erreicht werden, jedoch nicht eine Verbesserung der Responsivität. Eine Verbesserung der Responsivität, durch die Optimierung der Tcyp-Position in der Sequenz, wäre jedoch denkbar.

**Tabelle 4.3.4.2** Tcyp-TO-PNA-Sonden und die unmodifizierten TO-PNA-Sonden.

| Sonde                | $I_0$ | I   | $I/I_0$ | Sonde        | $I_0$ | I     | $I/I_0$ |
|----------------------|-------|-----|---------|--------------|-------|-------|---------|
| <b>Tcyp-TO-PNA-1</b> | 556   | 330 | 0.6     | <b>NA72a</b> | 23.8  | 73.8  | 3.1     |
| <b>Tcyp-TO-PNA-2</b> | 169   | 541 | 3.2     | <b>NA72b</b> | 8.1   | 88    | 10.8    |
| <b>Tcyp-TO-PNA-3</b> | 87    | 109 | 1.2     | <b>NA72c</b> | 24.6  | 44.3  | 1.8     |
| <b>Tcyp-TO-PNA-4</b> | 503   | 523 | 1       | <b>NA72d</b> | 46.2  | 106.3 | 2.3     |
| <b>Tcyp-TO-PNA-5</b> | 112   | 81  | 0.7     | <b>NA72f</b> | 79.6  | 98.5  | 1.2     |

$I_0$  = Fluoreszenzintensität im Einzelstrang, I = Fluoreszenzintensität im Doppelstrang,  $I/I_0$  = Fluoreszenzsteigerung. Bedingungen: 1  $\mu$ M Sonde mit 5 Äq. RNA-Zielsequenz bei 37°C in PBS.  $\lambda_{ex}$  = 485 nm,  $\lambda_{em}$  = 500 - 650 nm. Die Werte der Sonden **NA72a** – **NA72f** entstammen aus der Dissertation von Dr. Elke Socher<sup>[26]</sup>.



---

### 4.3.5 Diskussion

Das vorliegende Kapitel ist eine Zusammenfassung aller in Nebenprojekten und Kooperationen durchgeführten Experimente bezüglich der Verbesserung der Eigenschaften von FIT-Sonden für die zelluläre Anwendung.

Der bereits von Hövelmann *et al.* untersuchte CB-Farbstoff zeigte in FIT-Sonden eine maximale Responsivität von  $I/I_0 = 195$  sowie Quantenausbeuten von 0.45 - 0.47. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigten die gute Anwendbarkeit des Farbstoffes im zellulären Umfeld. So wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Gaspar der Poly-A-Schwanz der mRNA mit einer **poly-dT-CB**-Sonde und der waschfreien FISH-Methode visualisiert. In Zusammenarbeit mit Haralampiev *et al.* wurde eine CB-FIT-Sonde als panspezifischer Sensor, in drei verschiedenen Zelllinien (A549, HeLa und MDCK), zur Markierung der svRNA durch FISH eingesetzt. Es konnten die verschiedenen Phasen der Influenza A Infektion über die Zeit beobachtet werden. Mit einem 10-fachen Überschuss an PG-Amin konnte die FIT-Sonde zudem in lebende A549-Zellen eingebracht werden. Es wurde somit belegt, dass die FIT-Sonden in der Lage waren mithilfe von Polyglycerolen die Zellmembran zu durchdringen. Der Erfolg der Transfektion hängt dementsprechend nicht nur von den Transfektionsmolekülen, sondern ebenfalls von der verwendeten Zelllinie ab.

Der gleichermaßen von Hövelmann *et al.* untersuchte CV-Farbstoff wurde in dieser Arbeit in DNA-LNA-Sonden eingebaut und erreichte nach der Hybridisierung mit der RNA-Zielsequenz einen Fluoreszenzanstieg von  $I/I_0 = 19$ . Die absoluten Intensitäten im Einzel- und Doppelstrang konnten durch den Einbau eines LNA-Bausteins erhöht werden.<sup>[53a]</sup>

Beide Farbstoffe (CB und CV) wurden bereits zuvor von Lartia *et al.* über lange Alkylketten an das 5'-Ende oder an ein Phosphatrückgrat in Oligonukleotide eingebaut. Dabei zeigten die Farbstoffe bei der Hybridisierung kaum einen Anstieg der Fluoreszenz. Erst durch den Einbau in FIT-Sonden erzielten die Farbstoffe vielversprechende Eigenschaften.<sup>[128]</sup> Zuvor schienen sie aus sterischen Gründen nicht im Basenstapel zu interkalieren.<sup>[53a]</sup> Der Einsatz eines LNA-Bausteins in die Sequenz verbesserte zusätzlich in beiden Fällen die Fluoreszenzeigenschaften.

Die Synthese und der Einbau von Rot und Methylrot in FIT-Sonden lieferte keine brauchbaren Ergebnisse. Die resultierende Responsivität und Helligkeit im Doppelstrang fielen vergleichsweise gering aus. Die Intensität erniedrigte sich zudem durch die Hybridisierung mit der Zielsequenz. Die beiden Farbstoffe wurden zuvor von Bohländer *et al.* hergestellt und zeigten durch die Aggregation mit DNA einen 34 - 39-fachen Fluoreszenzanstieg.<sup>[90]</sup> Hier schien jedoch der Einbau

der Farbstoffe in die Sequenz zu keiner erhöhten Interkalation durch Hybridisierung mit der Zielsequenz zu führen, wodurch ein Fluoreszenzanstieg ausblieb.

Darüber hinaus wurde ein zyklisches Tcyp-Monomer in direkter Nachbarschaft zum TO zur Verbesserung der Fluoreszenzeigenschaften in PNA-Sonden eingesetzt. Es sollte das Konzept der Fluoreszenzsteigerung, analog zum LNA-Effekt, auf das FIT-PNA-Konzept übertragen werden.<sup>[8a]</sup>

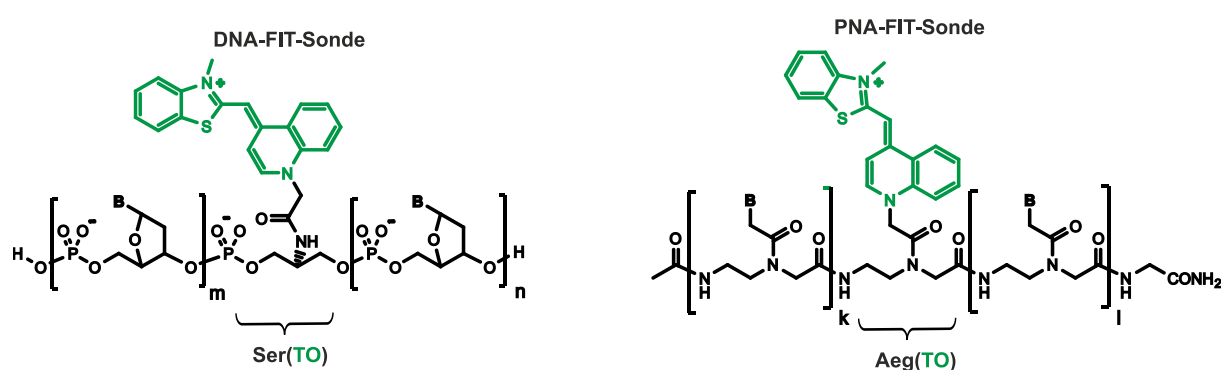
Der Einbau des Monomers in direkter Nachbarschaft zum TO-Farbstoff führte zur Steigerung der Fluoreszenzemission. Durch die bereits erhöhte Fluoreszenzintensität im Einzelstrang verschlechterte sich jedoch die Responsivität der Sonden. Der Einbau des Tcyp-Monomers in räumlicher Entfernung zum Farbstoff könnte in einer Verbesserung der Responsivität resultieren. In vielen Publikationen konnte bereits gezeigt werden, dass die Stabilität von PNA-DNA/RNA-Duplexstrukturen auch durch den Einbau weiterer zyklischer PNA-Monomere erhöht werden kann. So konnten Nielsen *et al.* darlegen, dass die Verwendung von trans-Cyclohexyl-PNA ebenfalls zu einer höheren Schmelztemperatur von PNA-DNA führt. Ein möglicher Ansatz bei der Modifikation von FIT-PNA-Sonden wäre somit die Variation der Ringgröße des Monomers sowie die Variation der Position.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1 Zusammenfassung

Die Visualisierung spezifischer mRNA-Sequenzen, die Untersuchung dynamischer Stoffwechselprozesse und die Informationsverarbeitung innerhalb von Zellen erfordern geeignete Werkzeuge. Modifizierte Oligonukleotide, wie z.B. fluoreszenzmarkierte Hybridisierungs sonden, können mitunter einen großen Beitrag zur Aufklärung leisten.<sup>[7a, 52, 116]</sup> Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es die genannten Prozesse in lebenden Zellen darzustellen.<sup>[14]</sup> Die in der Arbeitsgruppe Seitz entwickelten FIT-Sonden sind PNA- und DNA-basierte fluoreszente Hybridisierungs sonden, die ein Thiazolorange oder einen anderen Cyaninfarbstoff als Nukleobasensurrogat in der Sequenz enthalten (Abbildung 5.1.1).

PNA-FIT-Sonden kamen bereits in vorangegangenen Arbeiten für die Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen und in der Echtzeit-PCR zur Anwendung.<sup>[57-58]</sup> Aufgrund der schlechten Löslichkeit der PNA-FIT-Sonden sowie dem zeitlichen Synthesaufwand wurde das Konzept auf die DNA übertragen. Dabei wurde in Arbeiten von Bethge *et al.* mithilfe eines Serinol-Linkers ein geeignetes Umfeld für die Cyanin-Farbstoffe geschaffen. Hövelmann *et al.* optimierten zudem die Nukleaseresistenz der DNA-FIT-Sonden durch 2'-O-Me-RNA-Bausteine. Zusätzlich konnte die Fluoreszenzintensität durch den Einbau eines LNA-Monomers in die Sequenz gesteigert werden.<sup>[3]</sup>



**Abbildung 5.1.1** Schematische Darstellung der PNA- und DNA-FIT-Sonden.

Es gelang bereits das Einbringen von TO-PNA-FIT-Sonden in MDCK-Zellen durch Streptolysin-O<sup>[8b]</sup> und die Mikroinjektion von Mixmer-Sonden in Oozyten der *Drosophila Melanogaster*.<sup>[3]</sup> Da die Mikroinjektion jedoch nicht mit allen Zelllinien kompatibel ist, benötigte es einer Untersuchung und Optimierung der Sondaufnahme durch lebende Zellen. Dafür wurde in dieser Arbeit eine systematische Untersuchung der Zellaufnahme von DNA- und PNA-FIT-Sonden durch genetisch veränderte *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen durchgeführt.

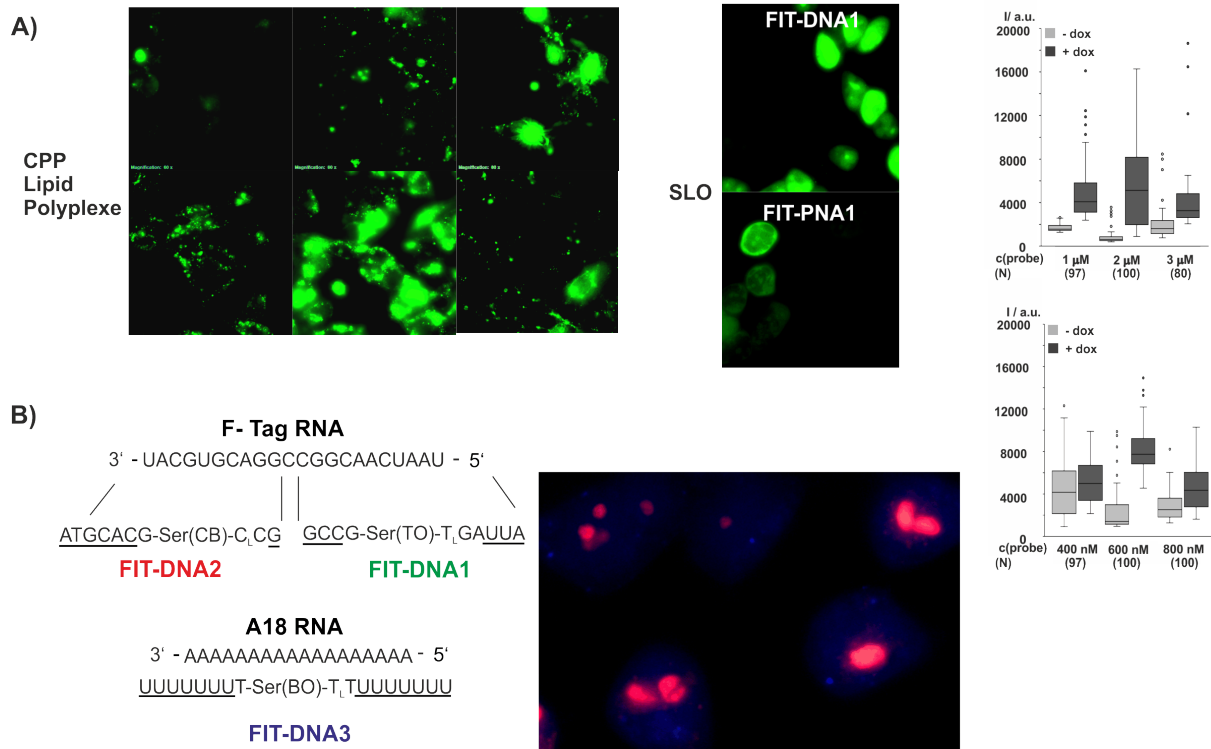
## 5.1 Zusammenfassung

Die Zelllinie enthält ein Plasmid mit 45 Wiederholungseinheit einer 22 Nukleotid langen Sequenz (5' TAA TCA ACG GCC GGA CGT GCA T 3'), die als Zielsequenz für die DNA- und PNA-FIT-Sonden diente. Es erfolgte die Synthese zellpenetrierender Peptide sowie deren Kupplung an FIT-Sonden. Als Bindungsart diente eine Thiol-Maleimid- und Disulfid-Verbindung. Letztere verfügt über den Vorteil innerhalb der Zelle spaltbar zu sein und erleichtert dementsprechend die Hybridisierung mit der Zielsequenz.

Die *in vitro* Fluoreszenzuntersuchungen zeigten für die Mehrheit der PNA-basierten Sonden-Konjugate eine erniedrigte Responsivität im Vergleich zur unmodifizierten PNA. Es konnte jedoch zeitgleich eine erhöhte Intensität der Fluoreszenzemission, verursacht durch die Wechselwirkung mit den Peptiden, beobachtet werden. Die DNA-basierten Sonden-Konjugate wiesen hingegen wenig Veränderung in ihren Eigenschaften auf. Die Aggregation mit Oktaarginin sowie Polyglycerol-Amin konnte sowohl die TO-Emission im Doppelstrang als auch die Schmelztemperatur erhöhen. Die Palmitinsäure besaß hingegen einen fluoreszenzerniedrigenden Einfluss auf die TO-Emission und die Responsivität.

Ein Vergleich der Sonden in den Zellexperimenten zeigte beim Einsatz zellpenetrierender Peptide ein erhöhtes Aufkommen punktueller Fluoreszenzsignale in den Zellen, die wahrscheinlich auf eingeschlossene Sonden in den Endosomen zurückzuführen waren. Trotz dessen konnte bereichsweise ein Unterschied in der TO-Emission zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen beobachtet werden. Die fluoreszenten Aggregate erschwerten jedoch die Auswertung (Abbildung 5.1.2 A). Der Einsatz eines Lipids oder Polyglycerol-Amins resultierte in ähnlichen Ergebnissen. Die Elektroporation der adhärenen Zellen führte durch die aufwändige Versuchsdurchführung zusätzlich zu zellulären Stress und vermehrtem Zelltod. Letztendlich brachte das porenbildende Enzym Streptolysin-O den gewünschten Effekt der Transfektion (Abbildung 5.1.2 A). Es konnte eine bis zu 450% erhöhte Fluoreszenz in den stimulierten Zellen beobachtet werden. Die Verwendung von SLO ist dabei gleichermaßen für DNA- als auch PNA-basierte FIT-Sonden geeignet, unabhängig vom verwendeten Cyaninfarbstoff. Die Vorteile dieser Methode liegen in der hohen Transfektionsrate, geringen Zytotoxizität, homogenen Verteilung und hohen Responsivität der Sonden. Die Bildung von Aggregaten blieb hierbei vollständig aus. Ebenfalls ermöglichte die Methode den simultanen Einsatz von drei Farbstoff markierten FIT-Sonden für eine erfolgreiche Dreifarben-Lebendzell-Bildgebung (Abbildung 5.1.2 B). Die Selektivität der Sonden blieb dabei unberührt. Das SLO stellt demnach eine optimale Wahl für die Mehrfarben-Bildgebung mit DNA-sowie PNA-Sonden in lebenden Zellen dar.

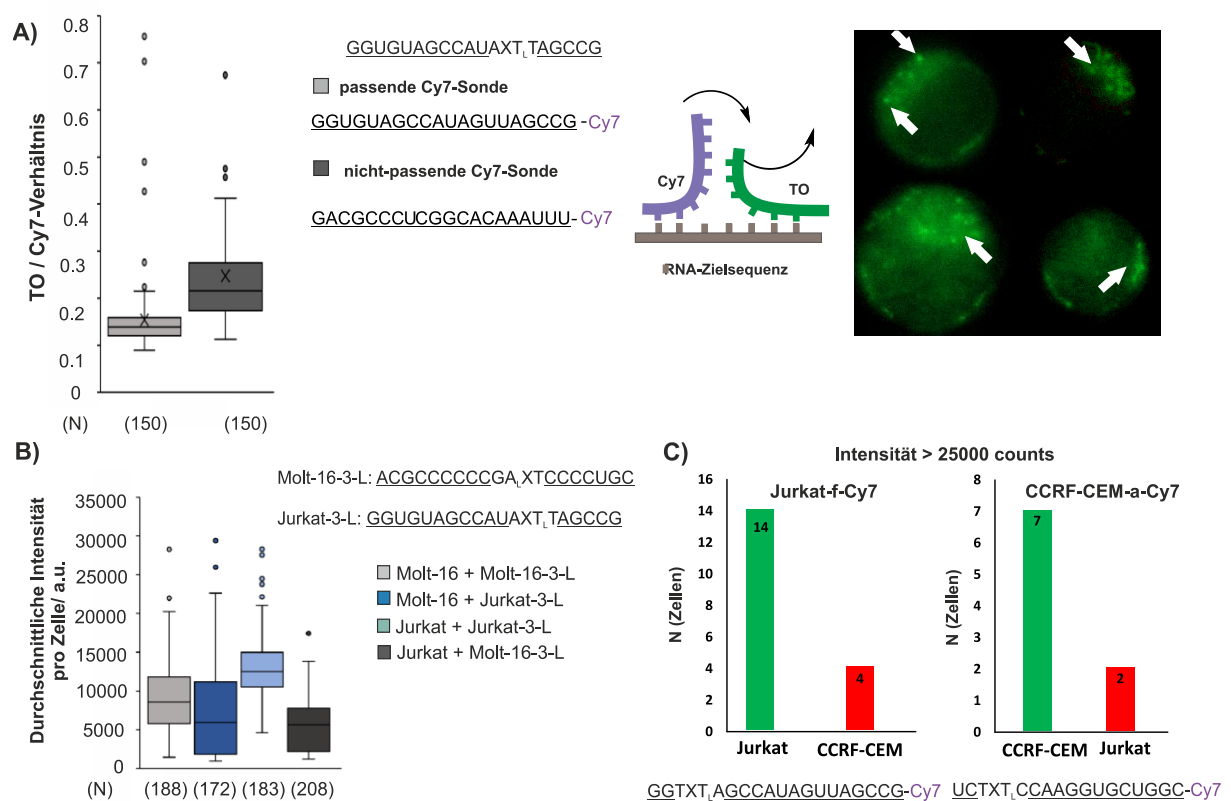
## 5.1 Zusammenfassung



In einer weiteren biologischen Fragestellung wurden die FIT-Sonden zur Unterscheidung verschiedener T-Zelllinien eingesetzt. 2010 konnten bereits erste therapeutische Erfolge durch Anwendung gentechnologisch veränderter T-Zellen, der so genannten CAR-T-Zellen, verzeichnet werden.<sup>[112]</sup> Bei dieser Therapie werden körpereigene T-Zellen *ex vivo* mit einem CAR ausgestattet, welche anschließend vorhandene Krebszellen erkennen und vernichten.<sup>[113]</sup> Bestimmte körpereigene T-Zellen besitzen dieselben Eigenschaften. Aus diesem Grund sollte es möglich sein durch deren Isolation mit anschließender *ex vivo* Vermehrung und erneuter Zufuhr in den Patienten, zu einer Stärkung des Immunsystems beizutragen. Hierfür wurden TO-markierte FIT-Sonden, komplementär zur spezifischen CDR3-Region der TCR-mRNA, für drei T-Zelllinien (Molt-16, CCRF-CEM und Jurkat) hergestellt. Durch Elektroporation konnten die Sonden in die Zellen eingebracht und anschließend über die Fluoreszenzemission analysiert werden. Die Optimierung der Versuchsbedingungen, wie der Sondenkonzentration, der Elektroporationsbedingungen und Erhöhung des mRNA-Levels durch Stimulation der Zellen führten zu einer Verbesserung der Ergebnisse. Ein Verdrängungsexperiment mit den Jurkat-Zellen, unter gleichzeitiger Verwendung einer zur TCR-mRNA komplementären TO-FIT- sowie Cy7-Sonde,

## 5.1 Zusammenfassung

zeigte eine um 40% erniedrigte TO-Emission (Abbildung 5.1.3 A). Diese Fluoreszenzerniedrigung blieb nach der Zugabe einer nicht-komplementären Cy7-Sonde aus. Die Verwendung der Jurkat- und Molt-16-Zellen sowie zweier dazu komplementärer FIT-Sonden erlaubte die Unterscheidung beider Zelllinien durch die spezifische TO-Fluoreszenzemission. 50% der Molt-16-Zellen zeigten mit der **Molt-16-3-L** eine Fluoreszenzintensität größer als 8500. Diesen Wert erreichten lediglich 25% der Jurkat-Zellen. Beim Einsatz der **Jurkat-3-L** wiesen 75% der Jurkat-Zellen einen Wert größer als 12 000 auf. Diesen erreichten nur ca. 25% der Molt-16-Zellen (Abbildung 5.1.3 B). Dementsprechend konnten mithilfe der Sonden die dazu komplementären Zellen mehrheitlich markiert werden.



**Abbildung 5.1.3** A) Ergebnisse der Verdrängungsexperimente unter Verwendung der Jurkat-Zellen, dargestellt in einem Box-Diagramm. Schematische Darstellung der Verdrängung der FIT-Sonde durch die Cy7-Sonde und Fluoreszenzbilder von Jurkat-Zellen mit 500 nM FIT-Sonde. B) Die Ergebnisse der Fluoreszenzexperimente mit Molt-16- und Jurkat-Zellen dargestellt in einem Box-Diagramm. Die Auswertung erfolgte durch ROI. C) Ergebnisse der Fluoreszenzexperimente mit Jurkat- und CCRF-CEM-Zellen, dargestellt in einem Balkendiagramm. Die Diagramme beziehen sich jeweils auf die Anwendung einer spezifischen Sonde und den damit markierten Zellen. Grün = Zellen mit komplementärer Zielsequenz; Rot = Zellen mit nicht-komplementärer Zielsequenz, N = Anzahl der Zellen.

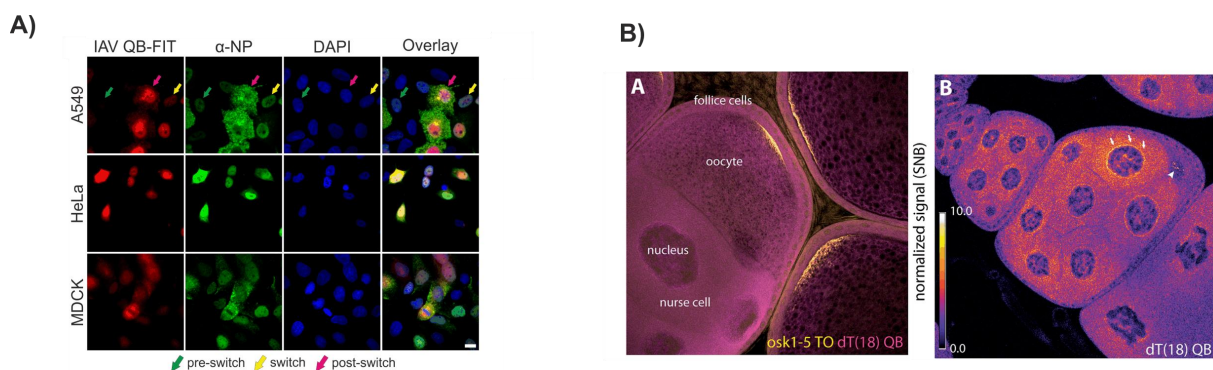
Der Einsatz eines terminalen Cy7-Farbstoffs bot mit einem zweiten Detektionskanal zudem die Möglichkeit die Cy7-Intensität und die vorhandene TO-Intensität ins Verhältnis zu setzen, sodass Signale ungebundener Sonde leichter ausgeschlossen werden konnten. Durch eine zusätzliche Stimulation der Zellen und dem Einsatz Cy7-markierter TO-FIT-Sonden konnte eine klare Unterscheidung zwischen den Jurkat- und CCRF-CEM-Zellen getroffen werden. Die mit der

## 5.1 Zusammenfassung

**Jurkat-f-Cy7** als „positiv“ markierten Zellen stellten dabei zu 82% die Jurkat-Zellen dar. Die mit der **CCRF-CEM-a-Cy7** selektierten Zellen bestanden zu 87% aus CCRF-CEM-Zellen. Die Ergebnisse sind in einem Balkendiagramm in Abbildung 5.1.3 C dargestellt, wobei die Zellen mit der komplementären Sonde grün markiert und die Zellen mit der nicht-komplementären Sonde rot markiert sind. Durch eine Messung am FACS wäre bereits die Isolation einer Mischpopulation mit einem erhöhten Aufkommen einer Zelllinie mit der komplementären FIT-Sonde möglich.

Ferner wurden CB-FIT-Sonden zur Untersuchung zellulärer Prozesse in lebenden und fixierten Zellen verwendet. Die Synthese und der Einsatz des bereits von Hövelmann *et al.* entwickelten Chinolinblau ermöglichte es den Infektionsverlauf des Influenza A Virus in A549-Zellen durch FISH zu visualisieren (Abbildung 5.1.4 A). Durch die Selektivität der **IAV-CB-4-L** für unterschiedliche Influenza A Viren konnte die Sonde in verschiedenen Zelllinien als spezifischer Influenza A Marker dienen. Zusätzlich gelang durch die Aggregation mit Polyglycerol-Amin ein erfolgreicher Transport der FIT-Sonden in A549-Zellen. Die Fluoreszenz der Sonden lag verstärkt in den Zellkernen vor, wobei die nachfolgende Markierung mit einem NP-Antikörper und die damit einhergehende Kollokalisierung der Fluoreszenzkanäle die Selektivität der Sonde bestätigte.

In Arbeiten mit Dr. Gaspar (EMBL, Heidelberg) wurde eine CB-FIT-Sonde zur Markierung vom Poly-A-Schwanz der mRNA in Oozyten der *Drosophila Melanogaster* eingesetzt. Durch die waschfreie FISH-Methode konnte ein kontrastreiches Fluoreszenzbild mit geringer Hintergrundfluoreszenz erhalten werden (Abbildung 5.1.4 B).

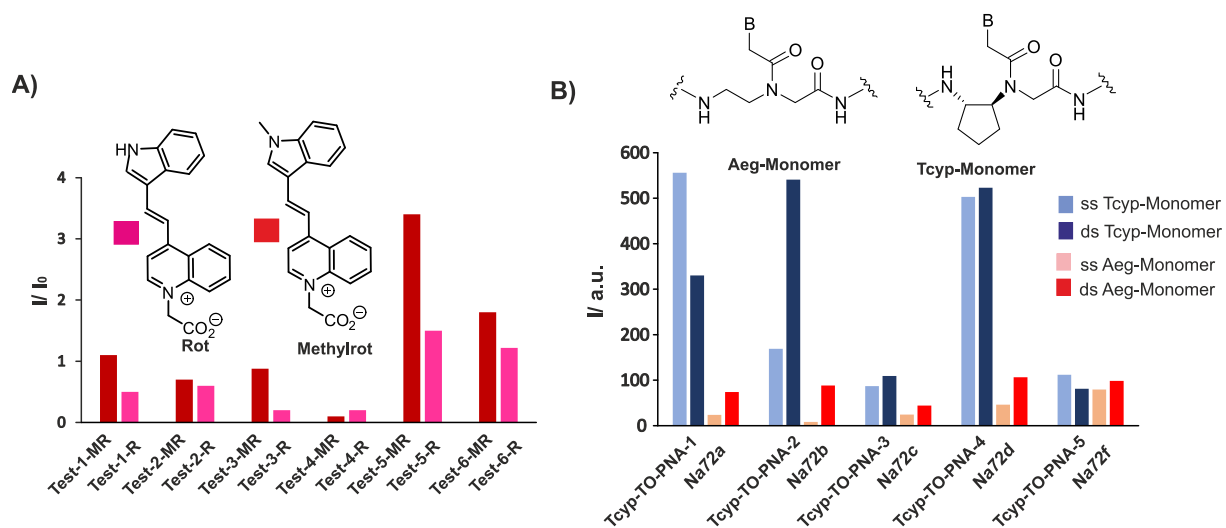


**Abbildung 5.1.4** A) 8 - 10 h mit Panama A infizierte A549, fixiert und anschließend durch FISH mit **IAV-CB-4-L** Sonde (rot), α-NP (grün) und DAPI (blau) angefärbt. Die farbigen Pfeile zeigen die verschiedenen Infektionsstadien des Virus: *pre-switch* (grün), *switch* (gelb) und *post-switch* (violett). B) Fluoreszenzbilder von fixierten Oozyten der *Drosophila Melanogaster* unter Verwendung einer **Poly-T-CB**-Sonde zur Markierung der Poly-A-Schwänze von mRNA.

Zur Verbesserung der FIT-Sondeneigenschaften wurden zudem neue Farbstoffe im grünen Wellenlängenbereich hergestellt und untersucht. Die von Bohländer *et al.* entwickelten Farbstoffe Rot und Methylrot wurden dafür in DNA-FIT-Sonden eingebaut und am Fluoreszenzspektrometer vermessen. In Abbildung 5.1.5 A sind die Fluoreszenzanstiege der sechs Sonden dargestellt. Es zeigte sich, dass lediglich Fluoreszenzanstiege von max.  $I/I_0 = 3.4$  erreicht wurden. Die Farbstoffe

## 5.1 Zusammenfassung

eigneten sich durch ihre geringe Responsivität nicht für die Verwendung in FIT-Sonden. Ein zyklisches Tcyp-Monomer, welches in PNA-basierte FIT-Sonden eingebaut wurde, führte zu einem Anstieg der Fluoreszenzemission. Die Fluoreszenzintensität war jedoch bereits im Einzelstrang stark erhöht, wodurch sich die Responsivität der Sonden verschlechterte (Abbildung 5.1.5 B).



**Abbildung 5.1.5** A) Strukturformeln der hergestellten Farbstoffe Rot und Methylrot und die Fluoreszenzanstiege nach Hybridisierung mit komplementärer RNA-Zielsequenz, dargestellt in einem Balkendiagramm. B) Strukturformeln des Aeg- und Tcyp-Monomers und die Fluoreszenzintensität der Tcyp-PNA-FIT-Sonden im Einzel- (ss) und Doppelstrang (ds), dargestellt in einem Balkendiagramm.



---

### 5.2 Ausblick

Die in Kapitel 4.1 durchgeführten Untersuchungen der Transfektion von DNA- und PNA-FIT-Sonden zeigten, dass das SLO die geeignetste Methode für das Einbringen von FIT-Sonden in adhärenzte *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen darstellt. Es zeigte sich jedoch auch, dass für gewisse Zelllinien, wie z.B. die A549-Zellen, die Anwendung von Aggregaten vorteilhaft war oder im Fall der Suspensionszellen, die Elektroporation. Aus diesem Grund sollte in weiteren Arbeiten die Untersuchung verschiedener Transfektionsmethoden von unterschiedlichen FIT-Sonden und Zelllinien fortgesetzt und in einer Datenbank festgehalten werden, um in Zukunft auf die bereits vorhandene Erfahrung zurückzugreifen.

Die Selektion der T-Zellen mit FIT-Sonden sollte ebenfalls in weiteren Arbeiten fortgesetzt werden. Die bereits durchgeführten Messungen zeigten, dass eine Unterscheidung der Zelllinien mit den FIT-Sonden möglich war, jedoch signifikantere Unterschiede der Fluoreszenz für das Sortieren am FACS fehlten. Ein zweiter in die Sequenz eingebauter TO-Farbstoff könnte zur Erhöhung der Responsivität führen und die Selektion erleichtern. Durch den Einsatz zweier TO-Farbstoffe würde die TO-Emission im Einzelstrang, durch eine gegenseitige Wechselwirkung, verringert werden. Die Hybridisierung mit einer Zielsequenz und die damit einhergehende räumliche Entfernung der Farbstoffe würde wiederum in einer stark erhöhten Fluoreszenzemission resultieren.

Die Verwendung eines Chinolinblau-Farbstoffs wäre ebenfalls denkbar, da die Zellexperimente in der hier vorliegenden Arbeit die hohe Responsivität und ein gutes Signal-zu-Hintergrundverhältnis des CB belegten.

Ein rigides zyklisches Tcyp-Monomer in der TO-PNA-FIT-Sequenz führte zur Erhöhung der Helligkeit. Da die Fluoreszenzemission jedoch bereits im Einzelstrang stark erhöht vorlag und zur Verringerung der Responsivität führte, wäre eine weiterführende Positionsrasterung des Tcyp-Monomers in der Sequenz denkbar. Eine größere Distanz zum Farbstoff könnte den Einfluss des Monomers im Einzelstrang verringern. Des Weiteren ist die Verwendung weiterer zyklischer Monomere, mit abweichender Ringgröße, wie das trans-cyclohexyl-Monomer von Nielsen *et al.* oder die Pyrrolidiny-Monomere von Vilaivan *et al.*, möglich.<sup>[129]</sup>

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1 Allgemeine Vorschriften und Messgeräte

#### 6.1.1 Chemische Arbeiten

##### Chemische Reagenzien

Alle Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur mit Lösungsmitteln synthetischer Qualität durchgeführt. Für das Trocknen von Lösemitteln wurde Molekularsieb der Porengröße 3 Å der Firma *Alfa Aesar* (Massachusetts, USA) verwendet. Das Molekularsieb wurde vor dem Einsatz am Feinvakuum für mindestens vier Stunden bei 350 °C ausgeheizt. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser der Reinheitsstufe *Milli-Q-Pore* hergestellt. Die Aufbereitung des Wassers erfolgte mit einer *Millipore* Anlage der Firma *Membrapure* (Hennigsdorf, Deutschland). Die Atto-Farbstoffe, die zur Berechnung der Quantenausbeuten eingesetzt wurden, stammen von *ATTO-TEC* (Siegen, Deutschland). Die Oligonukleotide (Zielsequenz) wurden von den Firmen *ITD* (Iowa, USA) sowie *Biomers* (Ulm, Deutschland) erhalten. Fmoc-PNA-Monomere wurden von *Link Technologies* (Bellshill, Schottland) beschafft und die Fmoc-geschützten Aminosäuren von *Iris Biotech* (Marktredwitz, Deutschland). Das Tentagel R Ram Rinkamid-Harz wurde von *Rapp Polymere* (Tübingen, Deutschland), PyBOP und HCTU für die Festphasensynthesen wurden von *Novabiochem* (Saint Louis, USA) bezogen. Alle restlichen Chemikalien wurden von den folgenden Firmen erworben: *Sigma Aldrich* (Saint Louis, USA), *Alfa Aesar* (Ward Hill, USA), *Acros Organics* (Geel, Belgien), *TCI Europe* (Eschborn, Deutschland) und *AppliChem* (Darmstadt, Deutschland). Deuterierte Lösemittel wurden von *Deutero* (Kastellan, Deutschland) verwendet.

##### Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurde mit Hilfe von Kieselgel (60 F254) beschichteten Aluminiumplatten der Firma *Merck* (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Zur Detektion der Substanzen diente UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254$  nm. Die Laufhöhe, relativ zur Laufmittelfront, ist als  $R_f$ -Wert angegeben.

### **Flash-Säulenchromatographie**

Die säulenchromatographischen Trennungen wurden mit Kieselgel der Partikelgröße 35 - 70  $\mu\text{m}$  der Firma *MachereyNagel* (Düren, Deutschland) durchgeführt. Als mobile Phase dienten verschiedene Lösungsmittelgemische, angegeben in Volumenverhältnissen.

### **NMR-Spektroskopie**

Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Experimente wurden mit einem Gerät der Firma *Bruker* (Billerica, USA) vom Typ *AVANCE DPX 300 MHz* durchgeführt. Die chemische Verschiebung  $\delta$  ist in *parts per million* (ppm) angegeben. Als interner Standard dient das Protonen-Restsignal des deuterierten Lösungsmittels. Die Multiplizität der Signale ist folgendermaßen abgekürzt: Singulett (s), breites Singulett (bs), Dublett (d), Triplett (t), Dublett vom Dublett (dd) sowie Multiplett (m). Die Kopplungskonstanten (*J*) sind in Hertz (Hz) aufgeführt.

### **DNA Synthesizer**

Die DNA- Festphasensynthese erfolge an einem *MerMade-4* Synthesizer der Firma *Bioautomation* (Plano, USA). Alle verwendeten Reagenzien entsprachen der Qualitätsstufe „für DNA-Synthese“. Die Standardamidite (dT, dABz, dCBz und dGDMf) sowie die 2'-O-Methyl-modifizierten Amidite und das CPG (*Controlled Pore Glass*) wurden von *Link Technologies* (Bellshill, UK) bezogen und LNA-Monomere von *Exiqon* (Vedbaek, Dänemark). Alle Reagenzien und Lösungen zur DNA-Synthese wurden von *EMP-Biotech* (Berlin, Deutschland) erhalten und entsprechend den Herstellerangaben für die DNA-Synthese verwendet. Für die Synthese von DNA-Sonden wurde ein mit der entsprechenden Nukleobase beladenes CPG und für die 2'-O-Methyl-Sonden ein *3'-Spacer-C3*-CPG verwendet. Die Konzentration aller Phosphoramidite betrug 0.1 M. Für den Einbau der eigens hergestellten Phosphoramidite wurde eine Konzentration von 0.15 M in MeCN verwendet und die Kupplungszeit auf 2 x 4 min verlängert.

### **Peptidsynthesizer**

Die automatisierte Fmoc/*t*Bu-Festphasensynthese wurde in 10  $\mu\text{mol}$  Ansätzen unter Verwendung von 5 ml Spritzenreaktoren an einem *MultiPep RS*-Peptidsyntheseautomaten der Firma *Intavis AG* (Köln, Deutschland) durchgeführt. Folgendes Protokoll wurde hierbei verwendet:

---

**Fmoc-Abspaltung:** Das Harz wurde 6 min mit 1 ml DMF/Piperidin (4:1) behandelt. Nach Entfernen der Lösung wurde es erneut 2 min mit DMF/Piperidin (4:1) behandelt und das Harz anschließend mit DMF (3 x 800 µl) gewaschen.

**Kupplung:** Ein Voraktivierungsbehälter wurde mit einer DMF-Lösung aus Aminosäurederivat (4.0 Äq.), HCTU (3.8 Äq.), Oxyma Pure (4.0 Äq.) und NMM (10 Äq.) befüllt. Nach 1 min Voraktivierungszeit wurde die Lösung auf die Spritzenreaktoren gegeben. Nach 30 min wurde das Harz mit DMF (3 x 800 µl) gewaschen. Ab der 10. Aminosäure wurde dieser Kupplungsschritt ein zweites Mal wiederholt (Doppelkupplung).

**Capping:** Das Harz wurde mit Ac<sub>2</sub>O/2,6-Lutidin/DMF (5:6:89) behandelt. Nach 5 min wurde das Harz mit DMF (3 x 800 µl) gewaschen.

Am Ende jeder Synthese wurde das Harz mit DMF (6 x 800 µl) und DCM (6 x 800 µl) gewaschen.

### Semipräperative HPLC

#### DNA-/RNA-Oligonukleotide

Zur Reinigung der Oligonukleotide wurde ein *1105 HPLC System* der Firma *Gilson* (Wisconsin, USA) verwendet. Die Detektion und Fraktionierung erfolgte nach dem entsprechenden Vis-Detektorsignal (BO: 450 nm, Rot: 490 nm, TO: 500 nm, MR: 510 nm, CV: 540 nm, CB: 580 nm). Als mobile Phase wurde eine Mischung aus A = 0.1 M Triethylammoniumacetat, pH 7.5, aq. und B = MeCN verwendet. Die Trennung erfolgte mittels einer auf 55 °C temperierten *YMC-Triat C18* 150 x 100 mm mit einer Flussrate von 7 ml/min und den Gradienten:

- a) DMTr-on: 15 - 40% B in 10 min, A = 0.1 M Triethylammoniumacetat, aq., pH 7.4; B = MeCN
- b) DMTr-off: 5 - 20% B in 10 min, A = 0.1 M Triethylammoniumacetat, aq., pH 7.4; B = MeCN
- c) Thiol-DMTr-on: 20 - 55% B in 12 min, A = 0.1 M Triethylammoniumacetat, aq., pH 7.4;  
B = MeCN
- d) Lipid: 20 - 80% B in 19 min, A = 0.1 M Triethylammoniumacetat, aq., pH 7.4; B = MeCN

---

Oder an einer *YMC C18* 250 x 4.6 mm mit einer Flussrate von 1.5 ml/min mit den Gradienten:

e) DNA-Peptid-Konjugat: 5 - 35% B in 30 min, A = 0.1 M Triethylammoniumacetat, aq., pH 7.4;

B = MeCN

f) terminale Farbstoffe: 20 - 70% B in 15 min, A = 0.1 M Triethylammoniumacetat, aq., pH 7.4;

B = MeCN)

### Peptide und PNA

Für die Reinigung von Peptiden und PNA wurde ein Gerät der Serie *1100* der Firma *Agilent* (Santa Clara, USA) verwendet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 210$  nm. Als Trennsäule diente eine *Polaris 5 C18-A* 250 x 10.0 mm der Firma *Varian* (Palo Alto, USA). Die Flussrate betrug 15 ml/min und wurde mit einem binären Gemisch aus A = 98.9% Wasser, 1% MeCN, 0.1% TFA und B = 98.9% MeCN, 1% Wasser, 0.1% TFA betrieben.

### PNA-Peptid-Konjugate

Für die Aufreinigung der PNA-Peptid-Konjugate wurde ein Gerät der Serie *LaChrom Elite* der Firma *Hitachi* (Tokyo, Japan) verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines Fluoreszenz-Detektors bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 530$  nm. Als Trennsäule diente eine auf 55 °C temperierte *Polaris 5 C18-A* 250 x 4.6 mm der Firma *Varian* (Palo Alto, USA). Die Flussrate betrug 1 ml/min und wurde mit einer binären Lösung von A = 98.9% Wasser, 1% MeCN, 0.1% TFA und B = 98.9% Wasser, 1% MeCN, 0.1% TFA betrieben.

### MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI/TOF-Massenspektren wurden mit Hilfe eines *AXIMA Confidence* Spektrometers der Firma *Shimadzu* (Berlin, Deutschland) aufgenommen. Als Matrices wurden folgende Lösungen verwendet: SAP-Matrix = 10 mg/ml Trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxymethylsäure in ACN/H<sub>2</sub>O (1:1, 0.1% TFA), HPA-Matrix = 1:1 Verhältnis von 50 mg/ml 3-Hydroxypicolinsäure und 50 mg/ml Diammoniumcitrat in MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1) und THAP-Matrix = 28 mg/ml 2',4',6'-Trihydroxyacetophenonmonohydrat und 6 mg/ml Zitronensäurediammoniumsalz in MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1).

---

### Analytische HPLC und UPLC

#### Oligonukleotide

Für die analytische Auswertung der Oligonukleotide wurde ein *1105 HPLC System* der Firma *Gilson* verwendet. Als mobile Phase diente eine binäre Mischung aus A = 0.1 M Triethylammoniumacetat, pH 7.5, aq. und B = MeCN mit einer *YMC C18 250 x 4.6 mm* Flussrate von 1.5 ml/min. Die UV-VIS Detektion erfolgte bei 260 nm.

Gradient I     10% B bis 50% B in 10 min, Flussrate 1.5 ml/min

Gradient II     5% B bis 40 % B in 15 min, Flussrate 1.5 ml/min

Gradient III    30% B bis 70% B in 20 min, Flussrate 1.5 ml/min

Gradient IV     10% B bis 40% B in 33 min, Flussrate 1.5ml/min

Gradient V      5% B bis 40% B in 33 min, Flussrate 1.5 ml/min

Gradient VI     10% B bis 40% B in 30 min, Flussrate 1.5 ml/min

Gradient VII    10% B bis 70% B in 15 min, Flussrate 1.5 ml/min

Gradient VIII   10% B bis 70% B in 11 min, Flussrate 1.5 ml/ min

#### Peptide und PNA

Für die PNA sowie Peptidverbindungen wurden analytische LC-MS Messungen an einem *Waters ACQUITY UPLC QDa* System mit einer *ACQUITY UPLC BEH C18* Säule von *Waters* und einem binären Gemisch aus A = 98.9% Wasser, 1% ACN, 0.1% TFA und B = 98.9% ACN, 1% Wasser, 0.1% TFA mit einer Flussrate von 0.3 ml/min durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch einen variablen UV-VIS Detektor, der die Wellenlängen 210 nm, 260 und 280 nm aufgenommen hat.

Für die analytische HPLC/MS von einigen zellpenetrierenden Peptiden wurde ein Gerät der Serie 1100 der Firma *Agilent* (Santa Clara, USA) mit einem VL-Quadrupol-Massenspektrometer verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 210$  nm. Als Trennsäule diente eine auf 55 °C temperierte *Polaris 5 C18-A 250 x 4.6 mm* (Porengröße 180 Å) der Firma *Varian* (Palo Alto, USA). Die Flussrate betrug 0.3 ml/min. Als mobile Phase wurde ein binäres Gemisch mit den angegebenen Gradienten aus A = 98.9% Wasser, 1% MeCN, 0.1% Ameisensäure und B = 98.9% Wasser, 1% MeCN, 0.1% Ameisensäure verwendet.

---

### Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzemissionen wurden an einem *Cary Eclipse* Fluoreszenzspektrometer der Firma *Varian* (Kalifornien, USA) gemessen. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Messungen in Fluoreszenzpuffer (100 mM NaCl, 10 mM Phosphat, pH 7) mit einer Sondenkonzentration von 0.5  $\mu$ M in 1 ml- bzw. 150  $\mu$ l-Küvetten der Firma *Hellma* (Müllheim, Deutschland) durchgeführt. Es wurden stets 5 Äq. DNA- oder RNA-Zielsequenz beigefügt. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten bei 25 °C oder 37 °C, mit Anregungs- und Emissionsfilterschlitzbreiten von 5 nm, wobei stets der Hintergrund subtrahiert wurde. Die jeweiligen Farbstoffe wurden mit folgenden Anregungs- und Emissionswellenlängen gemessen: BO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 440 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 450 - 650 nm, Rot: :  $\lambda_{\text{ex}}$  = 480 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 490 - 750 nm, TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 700 nm, MR:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 494 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 505 - 750 nm, CV:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 530nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 545 - 750 nm, CB:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 560nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 575 - 750 nm.

### UV/Vis -Spektroskopie

Die Sonden- bzw. Peptid- oder auch Konjugatkonzentrationen wurden zunächst mittels eines *Nanodrop*-UV/Vis-Spektrometers von *Thermo-Scientific* (Massachusetts, USA) bestimmt. Zur Konzentrationskorrektur während den Fluoreszenzmessungen wurde ein *Cary 100 Bio* UV/Vis-Spektrometer der Firma *Varian* (Kalifornien, USA) verwendet. Sofern nicht anderweitig angegeben, wurden alle Messungen in Fluoreszenzpuffer (100 mM NaCl, 10 mM Phosphat, pH 7) durchgeführt. Die Messungen erfolgten in 1 ml - bzw. 150  $\mu$ l-Küvetten der Firma *Hellma* (Jena, Deutschland). Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten, Quantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten wurde zu jeder Fluoreszenzmessung die Konzentration der Sonden mit Hilfe der Absorption bei 260 nm bestimmt. Der jeweilige molare Extinktionskoeffizient bei  $\lambda$  = 260 nm wurde auf der Internetseite der Firma *Integrated DNA Technologies* (IDT Oligo Analyzer 3.1)<sup>[123b]</sup> erhalten. Zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten diente ein dA-Monomer als Näherung zum Farbstoff.

Zur Bestimmung der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) der Duplexe aus Sonde und Zielsequenz wurde die Lösung in drei Zyklen von 20 - 90 °C mit einer Heizrate von 0.5 °C/min erhitzt sowie abgekühlt und die Hyperchromizität der Duplexe bei 260 nm bestimmt. Die Schmelztemperaturen ( $T_M$ ) ergaben sich aus dem Wendepunkt der sigmoidalen Schmelzkurven, welche automatisch durch die *Varian*-Software bestimmt wurde.

---

### 6.1.2 Biologische Arbeiten

#### Biologische Reagenzien

Für die Arbeiten im biologischen Bereich wurden ausschließlich autoklavierte Verbrauchsmaterialien und Lösungen verwendet. Das Ethanol für die Zellexperimente wurde aus abs. Ethanol von *Sigma-Aldrich* (Missouri, USA) und sterilem Wasser auf 70% verdünnt. Zudem wurden Pipettenspitzen mit Filter der Firma *Biozym* (Oldendorf, Deutschland) verwendet. *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) von *Thermo Fisher Scientific* (Rockford, USA) sowie RPMI-1640 von *Merck* (Darmstadt, Deutschland) wurden steril für die Zellkultur eingesetzt. Das fetale Kalbserum wurde von *Merck* (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Antibiotika Penicillin und Streptomycin wurden von *Biochrome* (Berlin, Deutschland) und die Antibiotika Hygromycin, Blastidicin und Zeocin von *Invitrogen* (Carlsbad, USA) erhalten. Die Zellkulturflasche und die Kulturschalen wurden von *Greiner* (Kremsmünster, Österreich) verwendet. Zum Mikroskopieren der lebenden Zellen wurden 6- und 8-Kammer Mikroskopieplatten ( $\mu$  slide well) der Firma *Ibidi* (Planegg, Deutschland) eingesetzt. Zum Beschichten der Mikroskopieplatten wurde poly-D-Lysin der Firma *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) genutzt. Für das Anfärben des Zellkerns wurde Hoechst von *Sigma Aldrich* (Missouri, USA) bezogen. Zum Fixieren der Zellen diente *p*-Formaldehyd der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Rockford, USA).

#### Zellkultur

##### Zellkultur Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>

Die Zelllinie wurde aus dem Labor von Prof. Dr. Löwer (TU-Darmstadt) erhalten. Die Zellkultur wurde von Christina Klotz durchgeführt. Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>-Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10% fetalem Kalbserum, 1% Penicillin/Streptomycin und drei Antibiotika: Hygromycin (0.2 µg/ml), Blastidicin (0.045 µg/ml) und Zeocin (0.1 µg/ml) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde alle 2 - 3 Tage, je nach Zelldichte, gewechselt. Dabei wurden die Zellen durch die Behandlung mit Trypsin vom Flaschenboden abgelöst und anschließend passagiert. 1 - 2 Tage vor den Experimenten wurden die Zellen in *Tet-approved* Medium ohne Antibiotika kultiviert.



## 6.1 Allgemeine Vorschriften und Messgeräte

Die nachfolgende Zelllinien wurde aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Frohme (TH Wildau) erhalten. Die Zellkultur wurde von Dr. Christina Kuznia durchgeführt.

### Zellkultur Jurkat und Molt-16

Jurkat und Molt-16 wurden in RPMI-1640 mit 10% fetalem Kalbserum und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde alle 3 - 4 Tage, je nach Zelldichte, gewechselt. Ab einer Dichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml wurden die Zellen passagiert. Zum Passagieren wurde das Medium mit den Zellen entnommen, bei 100 rpm für 5 min zentrifugiert und die Zellen anschließend gezählt.  $4 \cdot 10^5$  Zellen/ml wurden daraufhin im neuen Medium aufgenommen.

### Zellkultur CCRF-CEM

Die CEM-CRFF Zellen wurden ebenfalls in RPMI-1640 mit 10% fetalem Kalbserum und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde alle 3 - 4 Tage, je nach Zelldichte, gewechselt. Ab einer Dichte von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml wurden die Zellen passagiert. Beim Passagieren wurde das Medium jedoch nicht abgesaugt, sondern zunächst die Zellen darin abzentrifugiert und zusammen mit den trypsinisierten Zellen für die weitere Zellkultur verwendet. Zum Passagieren wurde das Medium mit den Zellen bei 100 rpm für 5 min zentrifugiert und die Zellen gezählt.  $3 \cdot 10^5$  Zellen/ml wurden anschließend im neuen Medium aufgenommen.

### Lagern der Zellen

Die Zellen wurden in ihrem jeweiligen Medium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 10% DMSO in flüssigem Stickstoff bei -190 °C gelagert. Nach ca. 30 Passagen wurden die *Flp-In*<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup> für die Experimente neu aufgetaut, die Jurkat, Molt-16 und CEM-CRFF nach ca. 28 - 30 Passagen.

## **Fluoreszenzmikroskop**

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurde ein inverses *Olympus IX83* Mikroskop von *Olympus* (Hamburg, Deutschland) mit einem 10X/0.25 Objektiv und einem 60x/1.35 *UPLSAPO* Ölobjektiv (Hamburg, Deutschland) und einer *Orca Flash 4.0 V2* Kamera von *Hamamatsu* (Ammersee, Deutschland) verwendet. Für die Hellfeldmikroskopie wurde eine *JC12V100W* Halogenlampe von *Traydon* (Frechen, Deutschland) und für die Fluoreszenzaufnahmen eine LED Lampe *pE-4000* von *Cool LED*

---

(Andover, UK) mit folgenden Filtern: DAPI = 350/50 nm, BO = 458/80 nm, TO = 500/24 nm, CB = 575/25 und Cy7 = 740/73 nm von *AHF* (Pfrondorf, Germany) verwendet.

### Elektroporator I

Zur Elektroporation der *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>* wurde ein *GenePulserXcell<sup>TM</sup>* der Firma *Biorad* (Kalifornien, USA) mit *GenePulser Cuvettes* 0.2 cm verwendet. Die Durchführung erfolgte nach vorhandenem Protokoll vom Hersteller,<sup>[130]</sup> unter Verwendung der folgenden Bedingungen: 110 V, 25 ms, 1 Puls oder 240 V, 25 ms und 1 Puls.

### Elektroporator II

Zur Elektroporation der T-Zellen wurde ein *Neon<sup>TM</sup> Transfection System* von *Thermo Fisher* (Massachusetts, USA) verwendet. Die Elektroporationen wurden mit dem *Neon<sup>TM</sup> Transfection System 10 µl Kit* nach vorhandenem Protokoll vom Hersteller<sup>[131]</sup> durchgeführt. Es wurden, wenn nicht anders angegeben, folgende Bedingungen verwendet:

Jurkat: 1400 V, 20 ms, 1 Puls

CCRF-CEM: 1400 V, 20 ms, 1 Puls

Molt-16: 1200 V, 40 ms, 1 Puls

### Durchflusszytometer

Für das Messen der Zellen an einem Durchflusszytometer wurde ein *BD Accuri<sup>TM</sup> C6 Cytometer* von *BDBioscience* (New Jersey, USA) der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rurack am Bundesamt für Materialforschung und -prüfung (Berlin) verwendet. Es wurde mit einem blauen, als auch rotem Laser und folgenden Filtereinstellungen gearbeitet: TO = 533/30 nm, PI = 585/40 nm und Cy7 = 780/60 nm.

---

### 6.1.3 Tabelle der verwendeten Puffer

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Fluoreszenzpuffer          | 100 mM NaCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7.0  |
| TCEP-Puffer                | 5 mM TCEP, 10 mM NaCl, 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6.5  |
| Ligationspuffer            | 10 mM NaCl, 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6.5   |
| Harnstoffpuffer            | 0.1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.3 M KBr, 8 M Urea, 1 mM TCEP, pH 8.0                                    |
| PUS-Puffer                 | 100 nM TRIS, 100 mM NaOAc, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8.0  |
| 10 x TAE                   | 0.4 M Tris, 0.2 M Eisessig, 0.01 M EDTA, pH 8.5   |
| PBS                        | 140 mM NaCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2.7 mM KCl, 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.0 |
| Belebensmedium             | DMEM, 10% FBS, 2 mM ATP, 2 mM GTP   |
| Lebendzellpuffer           | PBS, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7.0  |
| Tyrodes-Puffer             | 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, pH 7.4                                |
| FISH-Hybridisierungspuffer | 20 nM Tris, pH 7.4, 60% Formamid  |

---

### 6.2 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1

#### 6.2.1 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.1

##### Herstellung der Maleimid-CPPs

10  $\mu$ mol *Tentage*<sup>®</sup>R RAM wurde mit Fmoc-Lysin-(Mmt)-OH beladen. Dafür wurde das Harz 15 min in DMF/Piperidin (4:1) zum Quellen gebracht und anschließend gewaschen (3 x DMF). 4.0 Äq. der Aminosäure, 4.0 Äq. Oxyma, 3.9 Äq. HCTU, 6.0 Äq. DIPEA wurden in DMF (0.2 M) gelöst und 45 min bei RT im Spritzenreaktor geschüttelt. Das beladene Harz wurde anschließend gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM, 3 x DMF), mit Ac<sub>2</sub>O/Lutidin/DMF (5:6:89) versetzt und 5 min geschüttelt. Es wurde abermals gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM, 3 x DMF) und mit DMF/Piperidin (4:1) für 4 min geschüttelt. Der Rest der Aminosäuren wurde am Peptidsynthesizer von *Intavis* gemäß des Festphasenprotokolls gekuppelt. Anschließend wurde das beladene Harz mit Ac<sub>2</sub>O/Lipidin/DMF (5:6:89) für 5 min behandelt, gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM) und im Hochvakuum getrocknet. Das Abspalten der MMT-Gruppe erfolgte durch eine Behandlung mit 1%-TFA in DCM (bis keine Rotfärbung mehr zu sehen war). Das beladene Harz wurde anschließend mit 1% DIPEA in DMF gewaschen (3 x) und mit einem Gemisch aus 4.0 Äq. 6-Maleinimidohexansäure, 3.9 Äq. HCTU, 6.0 Äq. DIPEA in DMF (0.2 M) 2 x 45 min bei RT geschüttelt. Das Harz wurde gewaschen (3 x DMF, 3 x DCM) und am Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Harz mit 1 ml TFA/Tis/Thioanisol (90:4:6) versetzt und 4 h geschüttelt. Die Abspaltlösung wurde in 0 °C kalten Ether (15 ml) gegossen, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Rückstand wurde anschließend über die semipräparative HPLC aufgereinigt.

##### Entschützung der Trityl-Schutzgruppe mit AgNO<sub>3</sub> und DTT

20 nmol der Trityl-DNA wurde in 0.1 M TEAA-Puffer (30  $\mu$ l) gelöst, mit AgNO<sub>3</sub> (10 Äq.) versetzt und 1 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde DTT (15 Äq.) zugegeben und 30 min bei RT geschüttelt. Das Rohprodukt wurde mit H<sub>2</sub>O auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und über eine NAP-Säule der Firma *GE Healthcare* (Chicago, USA) aufgereinigt und lyophilisiert. Anschließend wurde die DNA mithilfe der semipräparativen HPLC aufgereinigt.

---

### Entschützung und Kupplung von Maleimid-Peptid und Thiol-Oligonukleotid

Um die Disulfid-Schutzgruppe zu reduzieren, wurde die Sonde zunächst in entgastem TCEP-Puffer (5 mM TCEP, 10 mM NaCl, 10 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 6.5) gelöst (200 µM) und über Nacht bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Produkt mit 10% vol. 3 M Ammoniumacetat und 1 ml Isopropanol gefällt. Um das Thiol vor Oxidation zu schützen, wurde es unterm Argonstrom getrocknet und direkt (800 µM) im Ligationpuffer (10 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5) mit 4.0 Äq. Maleimid-Peptid für 2 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde Harnstoffpuffer (0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M KBr, 8 M Urea, 1 mM TCEP, pH 8) zugegeben und 30 min geschüttelt. Die Konjugate wurden über eine NAP<sup>TM</sup>-Säule der Firma *GE Healthcare* (Chicago, USA) und anschließend über eine semipräparative HPLC gereinigt.

### Generierung des asymmetrischem Disulfids

2,2'-Dithiobis(5-nitropyridin) (20 Äq.) wurde in einer Mischung aus Essigsäure/Wasser (3:1, 12 mM) gelöst und mit dem Peptid-Thiol (1.0 Äq.) versetzt. Die Reaktion wurde 12 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über die semipräparative HPLC aufgereinigt.

### Kupplung von Thiol-PNA und DTNP-Peptid

Thiol-PNA (1.0 Äq.) und das DTNP-Peptid (4.0 Äq.) wurden in Puffer (100 µM, 1 M HEPES, 6 M Gn-HCl, pH 6.8) gelöst und für 1 h bei 25 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Konjugat mit der *Merck-Hitachi*-HPLC aufgereinigt.

### Agarose Gel für die DNA-Peptid-Aggregation

Zunächst wurde 1 x TAE (TRIS-Acetate-EDTA-Puffer) aus einer 10 x TAE Stammlösung hergestellt. Anschließend wurden 0.3 g Agarose zu 30 ml 1 x TAE hinzugefügt und komplett gelöst bis keine Teilchen mehr in der Lösung sichtbar waren. Das Gel wurde in die Kammer gegossen, mit einem Kamm versehen und wurde für 30 min stehen lassen. Das Gel wurde anschließend in eine *Mini Trans-Blot Cell* von *Bio-Rad* (Hercules, USA) eingespannt. 12 pmol der FIT-Sonde (25<sup>-</sup> Ladungen) wurden vorher mit verschiedenen Ladungsäquivalenten von Oktaarginin (1, 2, 3, 4, 8, 12, 16) vermischt und anschließend auf das Gel aufgetragen (Gesamtvolumen: 10 µl). Die Gelelektrophorese erfolgte für 20 min bei 100 V in 1 x TAE Elektrophoresepuffer an einem

## 6.2 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1

*PowerPac HC* von *Bio-Rad*. Anschließend wurde die DNA 5 min mit *SYBRGold™* angefärbt und an einer *Kodak Image Station 4000 MM Pro* ( $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ ) gemessen.

### Analytische Daten zu Kapitel 4.1.1

**Tabelle 6.2.1.1** DNA-TO-Sonden.

| Sonde  | Sequenz, X=Ser(TO)              | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|--------|---------------------------------|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|        |                                 | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| DNA-1  | HS-TAA CTT AAT TCT TTX GTA      | 5829                       | 5829     | 9.8                               |
| DNA-2  | HS-TAA CTT AAX TCT TTA GTA      | 5838                       | 5839     | 8.9                               |
| DNA-3  | HS-TAX CTT AAT TCT TTA GTA      | 5829                       | 5829     | 8.8                               |
| DNA-24 | TTA XTT AAG TCG TTA GTC CGA TTG | 7543                       | 7544     | 7.9                               |

[a] *Shimadzu Axima-Confidence* MALDI-TOF-MS mit THPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient I.

**Tabelle 6.2.1.2** DNA-TAT-Konjugate.

| Sonde     | Sequenz, X=Ser(TO)          | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|-----------|-----------------------------|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|           |                             | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| DNA-1-TAT | TAT-TAA CTT AAT TCT TTX GTA | 7910                       | 7918     | 20.7                              |
| DNA-2-TAT | TAT-TAA CTT AAX TCT TTA GTA | 7919                       | 7923     | 20.5                              |
| DNA-3-TAT | TAT-TAX CTT AAT TCT TTA GTA | 7910                       | 7914     | 23.1                              |

[a] *Shimadzu Axima-Confidence* MALDI-TOF-MS mit THPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient V.

Die Peptidsequenz von **TAT-Maleimid** (<sup>Ac</sup>N-GRKKRRQRRRPPQK<sup>\*</sup>-NH<sub>2</sub>) wurde nach dem Protokoll unter Kapitel 6.2.1 und dem Protokoll zur automatisierten Synthese 6.1.1 nach Fmoc-Strategie als 10 µmol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2 x 2 min, 0.5 ml) behandelt und anschließend gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM). Das Produkt wurde nach dem unter 6.2.1 beschriebenen Protokoll vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 1.5 µmol, 15%

C<sub>88</sub>H<sub>157</sub>N<sub>39</sub>O<sub>20</sub> (2081.4 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+2TFA]<sup>2+</sup> (m/z) = 770.8, gefunden (m/z) = 770.1

(3 - 40% Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 2.3 min.

## 6.2 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1

---

Die Peptidsequenz von **Oktaarginin** ( $^{\text{Ac}}\text{N-RRRRRRRR-NH}_2$ ) wurde nach dem Protokoll unter Kapitel 6.2.1 und zur automatisierten Synthese 6.1.1 nach Fmoc-Strategie als 10  $\mu\text{mol}$  Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2 x 2 min, 0.5 ml) behandelt und anschließend gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM). Das Produkt wurde nach dem unter 6.2.1 beschriebenen Protokoll vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 2.5  $\mu\text{mol}$ , 25%

$\text{C}_{60}\text{H}_{112}\text{N}_{34}\text{O}_{12}$  (1308.5 g/mol)

ESI-MS: berechnet für  $[\text{M}+3\text{TFA}]^{3+}$  551.2 (m/z) =, gefunden (m/z) = 551.0

UPLC (3 - 40% Laufmittel B in 4 min):  $t_{\text{R}}$  = 1.56 min.

Die Peptidsequenz von **Penetratin-Maleimid** ( $^{\text{Ac}}\text{N-RQIKIWFQNRRMKWKKK}^{\ast}\text{-NH}_2$ ) wurde unter Kapitel 6.2.1 und zur automatisierten Synthese 6.1.1 nach Fmoc-Strategie als 10  $\mu\text{mol}$  Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2 x 2 min, 0.5 ml) behandelt und anschließend gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM). Das Produkt wurde nach dem unter 6.2.1 beschriebenen Protokoll vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 0.54  $\mu\text{mol}$ , 5.4%

$\text{C}_{127}\text{H}_{194}\text{N}_{38}\text{O}_{24}\text{S}_1$  (2608.1 g/mol)

ESI-MS: berechnet für  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  (m/z) = 870.6, gefunden (m/z) = 870.6

Agilent (3 - 90 % Laufmittel B in 20 min):  $t_{\text{R}}$  = 10.2 min.

Die Peptidsequenz von **SAP(E)-Maleimid** ( $^{\text{Ac}}\text{N-(VELPPP)}_3\text{K}^{\ast}\text{-NH}_2$ ) wurde nach dem Protokoll unter Kapitel 6.2.1 und zur automatisierten Synthese 6.1.1 nach Fmoc-Strategie als 10  $\mu\text{mol}$  Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2 x 2 min, 0.5 ml) behandelt und anschließend gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM). Das Produkt wurde nach dem unter 6.2.1 beschriebenen Protokoll vom Harz abgespalten und gereinigt.

Ausbeute: 1.14  $\mu\text{mol}$ , 11%

$\text{C}_{111}\text{H}_{172}\text{N}_{22}\text{O}_{29}$  (2278.1 g/mol)

ESI-MS: berechnet für  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  (m/z) = 1140.1, gefunden (m/z) = 1140.0

UPLC (3 - 90% Laufmittel B in 4 min):  $t_{\text{R}}$  = 2.65 min.

## 6.2 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1

---

Die Peptidsequenz von **Transportan-DTNP** ( $^{Ac}N$ -\*CGWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH<sub>2</sub>) wurde nach dem Protokoll unter Kapitel 6.2.1 und zur automatisierten Synthese 6.1.1 nach Fmoc-Strategie als 10  $\mu$ mol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2 x 2 min, 0.5 ml) behandelt und anschließend gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM). Anschließend wurde das Peptid mit 1 ml TFA/Tis/H<sub>2</sub>O/EDT (95.5:2:2:0.5) versetzt und 4 h bei RT geschüttelt. Die Abspaltlösung wurde in kalten Ether (15 ml) gegossen, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Rückstand wurde anschließend über die semipräparative HPLC aufgereinigt. Das Disulfid wurde nach dem unter 6.2.1 beschriebenen Protokoll generiert.

Ausbeute: 1.9  $\mu$ mol, 19%

C<sub>139</sub>H<sub>234</sub>N<sub>36</sub>O<sub>34</sub>S<sub>1</sub> (3225.4 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+3H]<sup>3+</sup> (m/z) = 1076.0, gefunden (m/z) = 1076.4

UPLC (3 - 90% Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 2.90 min.

Die Peptidsequenz von **Pep-1** ( $^{Ac}N$ -KETWWETWWTEWSQPKKKRKVC -NH<sub>2</sub>) wurde unter Kapitel 6.2.1 und zur automatisierten Synthese 6.1.1 nach Fmoc-Strategie als 10  $\mu$ mol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2 x 2 min, 0.5 ml) behandelt und anschließend gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM). Anschließend wurde das Peptid mit 1 ml TFA/Tis/H<sub>2</sub>O/EDT (95.5:2:2:0.5) versetzt und 4 h bei RT geschüttelt. Die Abspaltlösung wurde in kalten Ether (15 ml) gegossen, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Rückstand wurde anschließend über die semipräparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 4.9  $\mu$ mol, 49%

C<sub>141</sub>H<sub>203</sub>N<sub>37</sub>O<sub>34</sub>S<sub>1</sub> (2992.4 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+3H]<sup>3+</sup> (m/z) = 998.5, gefunden (m/z) = 998.3

UPLC (3 - 40% Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 4.01 min.

Die Peptidsequenz von **Pep-2-DTNP** ( $^{Ac}N$ -KETWFETWFTEWSQPKKKRKVC\* -NH<sub>2</sub>) unter Kapitel 6.2.1 und zur automatisierten Synthese 6.1.1 nach Fmoc-Strategie als 10  $\mu$ mol Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2 x 2 min, 0.5 ml) behandelt und anschließend gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM). Anschließend wurde das Peptid mit 1 ml TFA/Tis/H<sub>2</sub>O/EDT (95.5:2:2:0.5) versetzt und 4 h bei RT geschüttelt. Die Abspaltlösung wurde in kalten Ether (15 ml) gegossen, zentrifugiert und der Überstand



## 6.2 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1

abgenommen. Der Rückstand wurde anschließend über die semipräparative HPLC aufgereinigt. Das Disulfid wurde nach dem unter 6.2.1 beschriebenen Protokoll generiert.

Ausbeute: 5.7  $\mu\text{mol}$ , 57%

$\text{C}_{137}\text{H}_{201}\text{N}_{35}\text{O}_{34}\text{S}_1$  (3068.3 g/mol)

ESI-MS: berechnet für  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  (m/z) = 1023.7, gefunden (m/z) = 1023.3

UPLC (3 - 90% Laufmittel B in 4 min):  $t_R$  = 2.41 min.

Die Peptidsequenz von **MPG-DTNP** ( $^{\text{Ac}}\text{N}$ -GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKVC $^*$ -NH $_2$ ) wurde unter Kapitel 6.2.1 und zur automatisierten Synthese 6.1.1 nach Fmoc-Strategie als 10  $\mu\text{mol}$  Ansatz am TentaGel R RAM Harz (5.3 mg, 0.19 mmol/g) synthetisiert. Das Harz wurde mit DMF/Piperidin (4:1, 2 x 2 min, 0.5 ml) behandelt und anschließend gewaschen (5 x DMF, 10 x DCM). Anschließend wurde das Peptid mit 1 ml TFA/Tis/H $_2$ O/EDT (95.5:2:2:0.5) versetzt und 4 h bei RT geschüttelt. Die Abspaltlösung wurde in kalten Ether (15 ml) gegossen, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Rückstand wurde anschließend über die semipräparative HPLC aufgereinigt. Das Disulfid wurde nach dem unter 6.2.1 beschriebenen Protokoll generiert.

Ausbeute: 4.8  $\mu\text{mol}$ , 48%

$\text{C}_{134}\text{H}_{216}\text{N}_{38}\text{O}_{33}\text{S}_2$  (3105.1 g/mol)

ESI-MS: berechnet für  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  (m/z) = 1036.0, gefunden (m/z) = 1036.2

UPLC (3 - 90% Laufmittel B in 4 min):  $t_R$  = 2.6 min.

### 6.2.2 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.2 und Kapitel 4.1.3

#### Analytische Daten zu Kapitel 4.1.2 und Kapitel 4.1.3

**Tabelle 6.2.2.1** Mixmer-Sonden und DNA-Peptid-Konjugate.

| Sonde                   | Sequenz, X=Ser(TO)  | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup> |                           | $R_T$ / min <sup>b</sup> |
|-------------------------|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                         |   | berechnet                 | [M] <sup>+</sup> gefunden |                          |
| F-Tag-TO-DNA            | <u>GCCGXT<sub>L</sub>GAUUA</u>  | 3875                      | 3873                      | 8.85                     |
| F-Tag-CB-DNA            | <u>AUGCACGXC<sub>L</sub>CG</u>  | 3868                      | 3862                      | 8.95                     |
| Poly-U-BO-DNA           | <u>UUUUUUUTXT<sub>L</sub>TUUUUUUU</u>   | 5934                      | 5936                      | 8.80                     |
| F-Tag-TO-DNA-SAP(E)     | SAP(E)- <u>GCCGXT<sub>L</sub>GAUUA</u>  | 6349                      | 6341                      | 29.5 <sup>VI</sup>       |
| F-Tag-TO-DNA-Penetratin | Penetratin- <u>GCCGXT<sub>L</sub>GAUUA</u>  | 6679                      | 6672                      | 21.0 <sup>IV</sup>       |
| F-Tag-TO-DNA-Palmitin   | $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{N}_1\text{O}_4\text{P}_1$ - <u>GCCGXT<sub>L</sub>GAUUA</u> | 4270                      | 4270                      | 17.75 <sup>III</sup>     |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THPTA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient I.

---

### **F-Tag-TO-PNA:** HS-g c c g Aeg(TO) t g a t t a

C<sub>141</sub>H<sub>175</sub>N<sub>63</sub>O<sub>35</sub>S<sub>2</sub> (3376.4 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+3H]<sup>3+</sup> (m/z) = 1126.3, gefunden (m/z) = 1125.3.

UPLC (03 - 60 % Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 1.93 min.

### **F-Tag-TO-PNA-Penetratin:** <sup>Ac</sup>N-RQIKIWFQNRRMKWKKK\* -S- g c c g Aeg(TO) t g a t t a

C<sub>268</sub>H<sub>368</sub>N<sub>101</sub>O<sub>59</sub>S<sub>3</sub> (5983.5 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+5H]<sup>5+</sup> (m/z) = 1197.5, gefunden (m/z) = 1197.8.

UPLC (03 - 80 % Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 1.94 min.

### **F-Tag-TO-PNA-SAP(E):** <sup>Ac</sup>N-(VELPPP)<sub>3</sub>K\* -S- g c c g Aeg(TO) t g a t t a

C<sub>252</sub>H<sub>346</sub>N<sub>85</sub>O<sub>64</sub>S<sub>2</sub> (5653.5 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+5H]<sup>5+</sup> (m/z) = 1131.5, gefunden (m/z) = 1131.8.

UPLC (03 - 80 % Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 2.35 min.

### **F-Tag-TO-PNA-Transportan:** <sup>Ac</sup>N-LIKKALAALAKLNIKGLLYGASNLTWGC-S-g c c g Aeg(TO) t g a t t a

C<sub>275</sub>H<sub>405</sub>N<sub>97</sub>O<sub>67</sub>S<sub>2</sub> (6444.6 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+6H]<sup>6+</sup> (m/z) = 1075.3, gefunden (m/z) = 1075.2.

UPLC (03 - 80 % Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 2.84 min.

### **F-Tag-TO-PNA-Pep2:** <sup>Ac</sup>N-KETWFETWFTEWSQPKKKRKVC- S-g c c g Aeg(TO) t g a t t a

C<sub>273</sub>H<sub>372</sub>N<sub>96</sub>O<sub>67</sub>S<sub>2</sub> (6288.5 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+6H]<sup>6+</sup> (m/z) = 1049.1, gefunden (m/z) = 1048.6.

UPLC (03 - 80 % Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 2.30 min.

### **F-Tag-TO-PNA-MPG:** <sup>Ac</sup>N-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKVC- S-g c c g Aeg(TO) t g a t t a

C<sub>270</sub>H<sub>386</sub>N<sub>99</sub>O<sub>66</sub>S<sub>3</sub> (6325.9 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+6H]<sup>6+</sup> (m/z) = 1055.2, gefunden (m/z) = 1054.9.

UPLC (03 - 80 % Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 2.58 min.

## 6.2.3 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.4

### RNA Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit einem *RNeasy Mini Kit (50)* der Firma *Qiagen* (Hilden, Deutschland). Die RNA wurde laut des beigelegten Protokolls isoliert und anschließend in 30 µl RNase freiem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Konzentration mit einem Nanophotometer der Firma *Implen* (München, Deutschland) vermessen und die cDNA nach vorgegebenen Protokoll aus dem *High Capacity cDNA reverse Transcription Kit* von *Applied Biosystems* (Kalifornien, USA) mit Hilfe eines *TGradient* von *Biometra* (Göttingen, Deutschland) hergestellt und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

### PCR mit SYBRGold™

$2 \cdot 10^5$  *Flp-In*™ 293 *T-REx*™ Zellen wurden nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit 2 µg/ml Doxycyclin (15 min, 30 min, 45 min und 60 min), in phenolrotfreiem DMEM inkubiert, trypsinisiert und anschließend die RNA isoliert. Die nachfolgenden Arbeiten wurden von Dr. Andrea Knoll durchgeführt. Für die Echtzeit-PCR wurde ein *iQ-Thermocycler* der Firma *BioRad* (Hercules, USA) mit 20 µl in 96-Wellplates verwendet. Die Primer wurden über die *Primer-Blast Software*<sup>[77]</sup> ausgewählt und diese, wie auch die synthetischen Vergleichstemplate, von *Biomers* (Ulm, Deutschland) bezogen. Eine Negativkontrolle (*no template control*, NTC) wurde bei jeder Messung mitgeführt, wobei das Volumen der DNA durch Wasser ersetzt wurde. Alle Messungen wurden als Dreifachmessung (Triplikat) durchgeführt. Es wurden folgende Primer-Sequenzen verwendet:

*forward*: 5' CAGCTTTCTTGACAAAGTGGCA 3'

*reversed*: 5' ATTAGGATCCCCGGGCTG 3'

Als synthetische Sequenz für die Standardkurve diente:

5' CAGCTTTCTTGACAAAGTGGCATAATGATGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACC  
GGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCC 3'

Der Mastermix für 20 µl bzw. ein Well wurde aus: 9.8 µl H<sub>2</sub>O, 2.0 µl 10 x *Reaction buffer S*, 4.0 µl *Enhancer solution P*, 1.0 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µl dNTP's (10 mM Mix), 0.8 µl von jedem Primer, 1.0 µl *SYBRGold*™ (10-fach), 1.0 µl synthetische Sequenz, 1 Einheit *HotStart Taq* Polymerase zusammengesetzt. Alles wurde bei *VWR* (Pennsylvania, USA) bestellt. Die Lösungen wurden in Mikrotiterplatten überführt, mit einer durchsichtigen Klebefolie abgedeckt, zentrifugiert und anschließend folgendem Thermozyklierungsprogramm unterzogen: initiale Denaturierung bei 95 °C für 4 min gefolgt von 30 bis 40 Zyklen, eingeteilt in Denaturierung (95 °C, 10 s), einer Primer-Anlagerung (59 °C, 20 s) und Kettenverlängerung (72 °C, 20 s). Abschließend wurde auf 4 °C abgekühlt. Die Fluoreszenz wurde stets im Anlagerungsschritt jedes Zyklus gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mittels der logarithmischen Kalibrierungskurve:

$$\frac{\text{Kopien}}{\text{ng}} = 10^{\exp\left(\frac{\text{Ct}-39.855}{-3.4918}\right)}.$$

---

### 6.2.4 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.5

#### Lebendzell-Bildgebung mit FIT-Sonden-Konjugaten in PBS

Einen Tag vor der Fluoreszenzmikroskopie wurden 15 000 Zellen auf einem mit 0.01% poly-D-Lysin der Firma *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) beschichtetem 8-Kammer-Objektiv von *Ibidi* (Gräfelfing, Deutschland) ausgesät. 2 µg/ml Doxycyclin wurde 1 h vor der Transfektion zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS + 1 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und mit 1 µM PNA-Sonden-Konjugat oder 2 µM DNA-Sonden-Konjugat in PBS + 1 mM MgCl<sub>2</sub> für 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS + 1 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und in PBS oder phenolrotfreiem DMEM mikroskopiert.

#### Lebendzell-Bildgebung mit FIT-Sonden-Konjugaten in DMEM

Einen Tag vor der Fluoreszenzmikroskopie wurden 15 000 Zellen auf einem mit 0.01% poly-D-Lysin der Firma *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) beschichtetem 8-Kammer-Objektiv von *Ibidi* (Gräfelfing, Deutschland) ausgesät. 2 µg/ml Doxycyclin wurde 1 h vor der Transfektion zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden über Nacht mit 0.25 µM FIT-PNA-Konjugat oder 1 µM FIT-DNA-Konjugat in phenolrotfreiem DMEM ohne Antibiotika bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. 1 h vor der dem Mikroskopieren wurden die Zellen mit PBS + 1 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und mit 2 µg/ml Doxycyclin bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden abermals mit PBS + 1 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und in PBS oder phenolrotfreiem DMEM mikroskopiert.

### 6.2.5 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.6

#### Lebendzell-Bildgebung durch Elektroporation mit FIT-Sonden

Die Zellen wurden 1 - 2 Tage vor der Elektroporation passagiert, um am Tag der Elektroporation eine Konfluenz von 60 - 70% zu erhalten. Am Tag der Elektroporation wurden die Zellen zunächst trypsinisiert, mit Zellmedium versetzt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und PBS hinzugegeben. Die Zellen wurden nochmals vorsichtig gewaschen und ein Teil der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer mithilfe von Trypanblau gezählt. Die Zellen wurden abermals zentrifugiert (1000 rpm für 5 min) und in der Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Elektroporationspuffer (*Genepulser*) von *Biorad* (Kalifornien, USA) oder DMEM resuspendiert. Es

---

wurden 1  $\mu\text{M}$  oder 2  $\mu\text{M}$  **FIT-DNA1** eingesetzt und folgende Einstellungen verwendet: 110 V, 25 ms, 1 Puls oder 240 V, 25 ms und 1 Puls. Nach der Elektroporation der Zellen wurden diese in warmes DMEM mit 10% FCS, 1% Penicillin in einem 8-Kammer-Objektiv von *Ibidi* (Gräfelfing, Deutschland) übertragen und über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis sich die Zellen absetzten. Die Zellen wurden mit PBS + 1 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und für 1 h mit 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Doxycyclin stimuliert bevor sie mikroskopiert wurden.

### 6.2.6 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.7

#### SLO-Behandlung (Variante 1)

Einen Tag vor der Fluoreszenzmikroskopie wurden 15 000 Zellen auf einem mit 0.01% poly-D-Lysin der Firma *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) beschichtetem 8-Kammer-Objektiv von *Ibidi* (Gräfelfing, Deutschland) ausgesät. Das Streptolysin-O von *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) wurde in 350 U/10  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser aliquotiert und vor dem Mikroskopieren mit 10  $\mu\text{M}$  TCEP versetzt und für 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> reduziert. Anschließend wurden die Zellen mit **FIT-DNA1** und **FIT-PNA1** (500 nM und 1  $\mu\text{M}$ ) in 200  $\mu\text{l}$  Lebendzellpuffer für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit Lebendzellpuffer gewaschen und nach Bedarf 30 min in phenolrotfreiem DMEM bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> rehabilitiert. Die Mikroskopie erfolgte in phenolrotfreiem DMEM oder PBS.

#### SLO-Behandlung (Variante 2)

Einen Tag vor der Fluoreszenzmikroskopie wurden 15 000 Zellen auf einem mit 0.01% poly-D-Lysin der Firma *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) beschichtetem 8-Kammer-Objektiv von *Ibidi* (Gräfelfing, Deutschland) ausgesät. Das Streptolysin-O von *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) wurde in 350 U/10  $\mu\text{l}$  aliquotiert und vor dem Experiment mit 10  $\mu\text{M}$  TCEP für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> reduziert. Im Anschluss wurden die Zellen mit **FIT-DNA1** und **FIT-PNA1** (500 nM und 1  $\mu\text{M}$ ) gelöst in 200  $\mu\text{l}$  Tyrodes-Puffer für 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 3 x Tyrodes-Puffer gewaschen und bei Bedarf für 30 min in phenolrotfreiem DMEM bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen worden in phenolrotfreiem DMEM oder PBS mikroskopiert.

---

### Lebendzell-Bildgebung mit SLO und FIT-Sonden

Einen Tag vor der Fluoreszenzmikroskopie wurden 15 000 Zellen auf einem mit 0.01% poly-D-Lysin der Firma *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) beschichtetem 8-Kammer-Objektiv von *Ibidi* (Gräfelfing, Deutschland) ausgesät. 1 h vor der Transfektion wurden die Zellen mit 2 µg/ml Doxycyclin bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Anschließend wurde das Streptolysin-O von *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) in 350 U/10 µl aliquotiert und vor dem Experiment 30 min mit 10 µM TCEP bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> reduziert. Die Zellen wurden zunächst mit Lebendzellpuffer gewaschen und anschließend mit 30 U SLO in 200 µl Lebendzellpuffer und unterschiedlichen FIT-Sonden Konzentrationen für 10 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden mit Lebendzellpuffer gewaschen und bei Bedarf für 1.5 h in Belebungsmedium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor der Mikroskopie wurden die Zellen nochmals mit Lebendzellpuffer gewaschen, für 5 min mit Hoechst in PBS versetzt, abermals mit Lebendzellpuffer gewaschen und anschließend in diesem auch mikroskopiert. Bei längeren Messungen wurde in phenolrotfreiem DMEM gemessen.

### 6.2.7 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.8

#### Viabilitätstest

Einen Tag vor der Fluoreszenzmikroskopie wurden 15 000 Zellen auf einem mit 0.01% poly-D-Lysin der Firma *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) beschichtetem 8-Kammer-Objektiv von *Ibidi* (Gräfelfing, Deutschland) ausgesät. 2 µg/ml Doxycyclin wurde 1 h vor der Transfektion zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden mit der jeweiligen Transfektionsmethode behandelt. Anschließend wurden die Zellen 2 x PBS + 1 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen, mit 200 µl Propidiumiodid in PBS (1µg/ml) 5 min inkubiert und abermals mit PBS + 1 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen. Es folgte die Inkubation der Zellen mit Hoechst in PBS (5 µg/ml) für nochmals 5 min. Die Zellen wurden wiederholt mit PBS + 1 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und anschließend 100 - 180 Zellen über die Zellkernfärbung im 10 x Objektiv gezählt. Die Anzahl der Zellen wurde durch die Anzahl toter Zellen (Signal des Propidiumiodids) geteilt. Der Anteil toter Zellen wurde anschließend in % angegeben.

---

### 6.2.8 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.9

#### Mehrfarben-Lebendzell-Bildgebung mit SLO und FIT-Sonden

Die Durchführung der Mehrfarben-Lebendzell-Bildgebung mit SLO und drei verschiedener FIT-Sonden erfolgte analog zu der „Lebendzell-Bildgebung mit SLO und FIT-Sonden“ in Kapitel 6.2.6. Die Zugabe der **FIT-DNA1** (1  $\mu$ M), **FIT-DNA2** (1  $\mu$ M) und **FIT-DNA3** (4  $\mu$ M) erfolgte simultan in PBS + 1 mM MgCl<sub>2</sub>.

### 6.2.9 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.1.10

#### FISH mit PNA-FIT-Sonden

15 000 Zellen wurden auf einem Deckglas in einer 24-well Kulturplatte ausgesät und einen Tag später zunächst mit 2 x DPBS von Thermo Scientific (Rockford, USA) gewaschen und anschließend 10 min mit 4% *p*-Formaldehyd von *Thermo Fisher Scientific* (Rockford, USA) bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Waschen mit DPBS wurden die Zellen in 70% Ethanol von *Applichem* (Darmstadt, Deutschland) bei 4 °C über Nacht permeabilisiert. Das Ethanol wurde entfernt und mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen im FISH-Hybridizationpuffer (20 nM Tris (*Roth*, Karlsruhe, Deutschland) pH 7.4 mit 60% Formamid von *EMD Millipore* (Billerica, USA) 3 min auf 80 °C erhitzt. Der FISH-Hybridisierungspuffer wurde entfernt und die Zellen mit 100 nM der PNA-Sonden im FISH-Hybridisierungspuffer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die ungebundene Probe durch Waschen mit 3 x Hybridisierungspuffer und 3 x PBS entfernt. Die Deckgläser wurden abgenommen, auf einen Objektträger mit Eindeckmedium von *Vector laboratories* (Burlingame, USA) gelegt und mit farblosen Nagellack luftdicht befestigt.

## 6.3 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2

### 6.3.1 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.2

#### Analytische Daten zu Kapitel 4.2.2

Tabelle 6.3.1.1 T-Zellen-DNA-FIT-Sonden.

| Sonde           | Sequenz, X=Ser(TO)                 | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|-----------------|------------------------------------|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|                 |                                    | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| CCRF-CEM-Test-a | TCTGTCCCAAGGXT <sub>L</sub> GCTGGC | 6308                       | 6306     | 7.62                              |
| CCRF-CEM-Test-b | ATCTGTCCCAXG <sub>L</sub> GCTGCTGG | 6308                       | 6306     | 7.54                              |
| CCRF-CEM-Test-c | TCTGTCCCAAGGCTGXT <sub>L</sub> GGC | 6308                       | 6307     | 7.63                              |
| Molt-16-Test-a  | TGCGTATCTGXT <sub>L</sub> ACGCCCCC | 6228                       | 6226     | 7.28                              |
| Molt-16-Test-b  | ACGCCCCCGXC <sub>L</sub> TCCCCTGC  | 6132                       | 6130     | 7.34                              |
| Molt-16-Test-c  | ATACTGCXT <sub>L</sub> ATCTGTTACGC | 6266                       | 6268     | 7.82                              |
| Jurkat-Test-a   | TAGCCATAGXT <sub>L</sub> AGCCGAACA | 6318                       | 6318     | 7.87                              |
| Jurkat-Test-b   | AGCCGAACAGXT <sub>L</sub> CGAGAAAC | 6352                       | 6352     | 7.65                              |
| Jurkat-Test-c   | GGTGTAGCCXT <sub>L</sub> AGTTAGCCG | 6372                       | 6371     | 7.44                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THPTA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient I.

Tabelle 6.3.1.2 T-Zellen Mixmer-FIT-Sonden.

| Sonde        | Sequenz, X=Ser(TO)                        | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|--------------|---|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|              |   | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| CCRF-CEM-1-L | <u>UCUGUCCCAAGGXT<sub>L</sub>GCUGGC</u>   | 6870                       | 6869     | 7.26                              |
| CCRF-CEM-2-L | <u>UCUGUCCCAAGGCUGXT<sub>L</sub>GGC</u>   | 6870                       | 6868     | 8.02                              |
| CCRF-CEM-3-L | <u>UCTXT<sub>L</sub>CCCAAGGCUGCUGGC</u>   | 6844                       | 6841     | 7.86                              |
| CCRF-CEM-4-L | <u>UCUGUCCCAAGGCT<sub>L</sub>XCUGGC</u>   | 6832                       | 6835     | 7.33                              |
| CCRF-CEM-5-L | <u>UCUGUCCCAAGGCT<sub>L</sub>XCUGGC</u>   | 6830                       | 6830     | 7.40                              |
| Molt-16-1-L  | <u>UGCGUAUCUGXT<sub>L</sub>ACGCCCCC</u>   | 6790                       | 6790     | 8.07                              |
| Molt-16-2-L  | <u>UGCGUAUCUGXT<sub>L</sub>ACGCCCCC</u>   | 6804                       | 6807     | 7.64                              |
| Molt-16-3-L  | <u>ACGCCCCCGA<sub>L</sub>XTCCCCUGC</u>    | 6747                       | 6743     | 8.04                              |
| Molt-16-4-L  | <u>AUACUGCGUATXT<sub>L</sub>GUUACGC</u> * | 6989                       | 6988     | 7.84                              |
| Molt-16-5-L  | <u>AUAXT<sub>L</sub>GCUGUAUCUGUACGC</u>   | 6840                       | 6844     | 8.05                              |
| Jurkat-1-L   | <u>AGCCGAACAGXT<sub>L</sub>CGAGAAAC</u>   | 6970                       | 6973     | 8.65                              |
| Jurkat-2-L   | <u>GGUGUAGCCXT<sub>L</sub>AGUUAGCCG</u>   | 6934                       | 6935     | 7.26                              |
| Jurkat-3-L   | <u>GGUGUAGCCAUAXT<sub>L</sub>TAGCCG</u>   | 6932                       | 6934     | 7.64                              |
| Jurkat-4-L   | <u>GGTXT<sub>L</sub>AGCCAUAGUUAGCCG</u> * | 7068                       | 7070     | 8.70                              |
| Jurkat-5-L   | <u>GGUGT<sub>L</sub>XGCCAUAGUUAGCCG</u> * | 7069                       | 7070     | 8.50                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THPTA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient I, \* Alkin statt 3'-C-Spacer.



### 6.3.2 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.3

#### PCR mit SYBRGreen™

Für die Echtzeit-PCR wurde ein *iQ-Thermocycler* der Firma *BioRad* (Hercules, USA) mit 20 µl in 96-Wellplates verwendet. Die Primer wurden über die *Primer-Blast Software*<sup>[77]</sup> ausgewählt und diese, wie auch die synthetischen Vergleichstemplate, von *Biomers* (Ulm, Deutschland) bezogen. Eine Negativkontrolle (*no template control*, NTC) wurde bei jeder Messung mitgeführt, wobei die DNA durch Wasser ersetzt wurde. Alle Messungen wurden als Dreifachmessung (Triplikat) durchgeführt. Es wurden folgende Primer-Sequenzen verwendet:

Jurkat: *forward*: GAAGATCCAGCCCTCAGAACC; *reversed*: TACAAGGTTAACCTGGTCCC

Molt-16: *forward*: AACCATGCAAGCCTGACCTT; *reversed*: GGTGCCTGGGCCAAATACT

CCRF-CEM: *forward*: CAATCCCTGGAGCTTGGTGA; *reversed*: GAACACGTTTTTCAGGTCCTC

GAPDH: *forward*: CCTGCACCACCAACTGCTTA; *reversed*: TGGTCATGAGTCCTTCCACG

Als synthetische Sequenz für die Standardkurve diente folgende GAPDH-Sequenz:

5'CCTGCACCACCAACTGCTTAGCACCCCTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTGGTATCGTGGAAGGAC  
TCATGACCACAGTCCATGCCAT 3'

Als biologische Template diente cDNA aus den Jurkat, CCRF-CEM und Molt-16 Zellen. Diese wurden jeweils ohne Elektroporation, 10 min nach Elektroporation und 90 min nach Elektroporation isoliert. Der Mastermix wurde nach dem Protokoll des *QuantiFast SYBRGreen™ PCR Kit* verwendet. Die Lösungen wurden in Mikrotiterplatten überführt, mit einer durchsichtigen Klebefolie abgedeckt, zentrifugiert und anschließend folgendem Thermozyklierungsprogramm unterzogen: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 2 min gefolgt von 40 Zyklen, bestehend aus Denaturierung (95 °C, 15 s), Primer-Anlagerung (55 °C, 30 s.) und Kettenverlängerung (50 °C, 15 s). Abschließend wurde auf 4 °C abgekühlt. Die Fluoreszenz wurde stets im Anlagerungsschritt jedes Zyklus gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch die logarithmische Kalibrierungskurve:

$$\frac{\text{Kopien}}{\text{ng}} = 10^{\exp\left(\frac{\text{Ct}-44.972}{-4.0741}\right)}.$$

#### PCR mit FIT-Sonden

Für die Echtzeit-PCR wurde ein *iQ-Thermocycler* der Firma *BioRad* (Hercules, USA) mit 20 µl in 96-Wellplates verwendet. Die Primer wurden über die *Primer-Blast Software* ausgewählt und von *Biomers* (Ulm, Deutschland) bezogen. Eine Negativkontrolle (*no template control*, NTC) wurde bei

### 6.3 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2

jeder Messung mitgeführt, wobei die DNA durch Wasser ersetzt wurde. Alle Messungen wurden als Dreifachmessung (Triplikat) durchgeführt. Es wurden folgende Primer-Sequenzen verwendet:

Jurkat: *forward*: GAAGATCCAGCCCTCAGAACC; *reversed*: TACAAGGTTAACCTGGTCCC

Molt-16: *forward*: AACCATGCAAGCCTGACCTT; *reversed*: GGTGCCTGGGCCAAAATACT

CCRF-CEM: *forward*: CAATCCCTGGAGCTTGGTGA; *reversed*: GAACACGTTTTTCAGGTCCTC

Der Mastermix für 20 µl bzw. ein *Well* wurde aus: 9.8 µl H<sub>2</sub>O, 2.0 µl 10 x *Reaction buffer S*, 4.0 µl *Enhancer solution P*, 0.4 µl dNTP's (10 mM Mix), 0.8 µl von jedem Primer, 1.0 µl FIT-Sonde (10 µM), 20 ng cDNA, 1 Einheit *HotStart Taq* Polymerase zusammengesetzt. Alles wurde bei VWR (Pennsylvania, USA) bestellt. Die Lösungen wurden in Mikrotiterplatten überführt, mit einer durchsichtigen Klebefolie abgedeckt, zentrifugiert und anschließend folgendem Thermozyklierungsprogramm unterzogen: Initiale Denaturierung bei 95 °C für 4 min gefolgt von 50 Zyklen, eingeteilt in Denaturierung (95 °C, 10 s), einer Primer-Anlagerung (55 °C, 20 s) und Kettenverlängerung (72 °C, 20 s). Abschließend wurde auf 4 °C abgekühlt. Die Fluoreszenz wurde stets im Anlagerungsschritt jedes Zyklus gemessen.

#### 6.3.3 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.4

##### Elektroporation der T-Zellen und Vorbereitung zur Lebendzell-Bildgebung

Die Zellen mussten vor der Elektroporation zunächst in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe von Trypanblau gezählt und anschließend für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert werden. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^5$  Zellen/20 µl Elektroporationspuffer (*Neon™ Transfection System 10 µl Kit*, *ThermoFisher*) resuspendiert und nach vorhandenem *Neon™* Handbuch elektroporiert.<sup>[132]</sup> Dafür wurde zunächst das *Neon™ Tube* mit 3 ml Elektroporationspuffer aufgefüllt. Die FIT-Sonden wurden in der jeweiligen Konzentration zu den in einem 1.5 ml Eppendorfgefäß resuspendierten Zellen ( $2 \cdot 10^5$  Zellen/20 µl) vorsichtig hinzugegeben und miteinander vermischt. 10 µl der Zellsuspension wurde für eine Elektroporation mit der *Neon™* Pipette aufgezogen. Für eine höhere Zelldichte am Mikroskop konnten zwei Elektroporationen einer Sondenkonzentration zusammengefügt werden. Dabei sollten Luftblasen während der Elektroporation unbedingt vermieden werden. Die *Neon™* Pipette wurde in das *Neon™ Tube* gestellt und die Elektroporationsbedingungen (Jurkat und CCRF-CEM: 1400 V, 20 ms, 1 Puls und Molt-16: 1200 V, 40 ms, 1 Puls) eingestellt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 37 °C

### 6.3 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2

---

warmes RPMI (10 µl) mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1480 µl PBS gegeben und 3.5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 10 µl Propidiumiodid (1 µg/ml in PBS) zugegeben und die Zellen anschließend in ein 6-Kammer-Objektiv von *Ibidi* (Gräfelfing, Deutschland) überführt. Bei Langzeitmessungen wurden die Zellen nur in phenolrotfreiem RPMI gelöst und mikroskopiert.

#### ROI-Analyse der Zellen

Für die ROI-Analyse wurden die Mikroskopiebilder zunächst als TIF-Datei am *Olympus IX3* abgespeichert und anschließend mit der *Olympus IX3*-Software bearbeitet. Unter den Feldern „Count“ und „Measurements“ wurden die Zellen oder ein bestimmter Bereich manuell eingekreist und die Intensität in einer Excel-Tabelle (minimalste Intensität: Min, durchschnittliche Intensität: Mean und maximalste Intensität: Max) für jede einzelne Zelle erhalten. Die Excel-Tabelle konnte für weitere Analysen exportiert und bearbeitet werden.

### 6.3.4 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.5

#### Verdrängungsexperiment mit einer Cy7-Sonde

Die Durchführung der Elektroporation erfolgte analog zu „Elektroporation der T-Zellen und Vorbereitung zur Lebendzell-Bildgebung“ in Kapitel 6.3.3. Hierfür wurden 0.5 µM FIT- Sonde und 2.5 µM Cy7-Sonde zu den Zellen in Elektroporationspuffer zugegeben und mit folgenden Einstellungen: 1400 V, 20 ms, 1 Puls elektroporiert. Die Mikroskopiebilder wurden durch die ROI-Analyse ausgewertet.

### 6.3.5 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.7

#### Konjugation der Farbstoffe

Die Alkin-modifizierten FIT-Sonden (100 µM) wurden in 100 µl PUS-Puffer (100 mM TRIS, 100 mM NaOAc, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8) mit Ascorbinsäure (7.5 mM), THPTA als Kupfer-Ligand (3.75 mM) und Cy7-Azid (500 µM, aus Stocklösung in DMSO) gelöst. Anschließend wurde Kupfer(II)sulfat (0.75 mM) zugeben und die Mischung für 5 h bei 55 °C geschüttelt. Die Sonden wurden durch Zugabe von Isopropanol (1.5 ml) und Zentrifugation (14000 rpm, 10 min) gefällt. Der Überstand

## 6.3 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2

wurde abgenommen, der Rückstand 2 x Isopropanol gewaschen und schließlich in Wasser (500 µl) gelöst. Mittels Spritzenfilter von *Sarstedt* (Nümbrecht, Deutschland) wurden unlösliche Bestandteile entfernt und die Konjugate anschließend per HPLC gereinigt.

### Analytische Daten zu Kapitel 4.2.7

**Tabelle 6.3.5.1** Jurkat-Alkin-Sonden.

| Sonde          | Sequenz, X=Ser(TO),  | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|----------------|--|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|                |  | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| Jurkat-a-Alkin | <u>AGCCGAACAGXT</u> <sub>L</sub> <u>CGAGAAAC</u> -Alkin                      | 7105                       | 7105     | 7.87                              |
| Jurkat-b-Alkin | <u>AGCCGAACAGGTXG</u> <sub>L</sub> <u>AGAAAC</u> -Alkin                      | 7145                       | 7150     | 7.89                              |
| Jurkat-c-Alkin | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>C</sub> <u>CGXG</u> <sub>L</sub> <u>AAAC</u> -Alkin | 7107                       | 7107     | 7.87                              |
| Jurkat-d-Alkin | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>C</sub> <u>CGAGXA</u> <sub>L</sub> <u>AC</u> -Alkin | 7107                       | 7107     | 7.85                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THPTA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient I.

**Tabelle 6.3.5.2** Jurkat-Cy7-Sonden.

| Sonde        | Sequenz, X=Ser(TO), dye=Cy7  | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|--------------|--|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|              |  | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| Jurkat-a-Cy7 | <u>AGCCGAACAGXT</u> <sub>L</sub> <u>CGAGAAAC</u> -dye                      | 7772                       | 7779     | 14.70                             |
| Jurkat-b-Cy7 | <u>AGCCGAACAGGTXG</u> <sub>L</sub> <u>AGAAAC</u> -dye                      | 7812                       | 7810     | 14.60                             |
| Jurkat-c-Cy7 | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>C</sub> <u>CGXG</u> <sub>L</sub> <u>AAAC</u> -dye | 7774                       | 7769     | 14.50                             |
| Jurkat-d-Cy7 | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>C</sub> <u>CGAGXA</u> <sub>L</sub> <u>AC</u> -dye | 7774                       | 7768     | 14.70                             |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THPTA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

**Tabelle 6.3.5.3** Jurkat-Cy3-Sonden.

| Sonde        | Sequenz, X=Ser(TO), dye=Cy3  | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|--------------|--|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|              |  | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| Jurkat-a-Cy3 | <u>AGCCGAACAGXT</u> <sub>L</sub> <u>CGAGAAAC</u> -dye                      | 7680                       | 7675     | 10.3                              |
| Jurkat-b-Cy3 | <u>AGCCGAACAGGTXG</u> <sub>L</sub> <u>AGAAAC</u> -dye                      | 7720                       | 7718     | 10.3                              |
| Jurkat-c-Cy3 | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>C</sub> <u>CGXG</u> <sub>L</sub> <u>AAAC</u> -dye | 7682                       | 7679     | 10.3                              |
| Jurkat-d-Cy3 | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>C</sub> <u>CGAGXA</u> <sub>L</sub> <u>AC</u> -dye | 7682                       | 7677     | 10.3                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THPTA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII.

**Tabelle 6.3.5.4** Jurkat-CF660-Sonden.

| Sonde          | Sequenz, X=Ser(TO), dye=CF660  | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |           | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|----------------|--|----------------------------|-----------|-----------------------------------|
|                |  | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden  |                                   |
| Jurkat-a-CF660 | <u>AGCCGAACAGXT</u> <sub>L</sub> <u>CGAGAAAC</u> -dye                      | 7105                       | 7000-7400 | 10.3                              |
| Jurkat-b-CF660 | <u>AGCCGAACAGGTXG</u> <sub>L</sub> <u>AGAAAC</u> -dye                      | 7145                       | 7000-7400 | 10.2                              |
| Jurkat-c-CF660 | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>C</sub> <u>CGXG</u> <sub>L</sub> <u>AAAC</u> -dye | 7107                       | 7000-7400 | 10.3                              |
| Jurkat-d-CF660 | <u>AGCCGAACAGGU</u> <sub>C</sub> <u>CGAGXA</u> <sub>L</sub> <u>AC</u> -dye | 7107                       | 7000-7400 | 10.1                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THPTA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VIII. Breite Peaks nur sichtbar.

## 6.3 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2

**Tabelle 6.3.5.5** TO-Cy7-Sonden.

| Sonde          | Sequenz, X=Ser(TO), dye=Cy7                                     | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|----------------|---|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|                |   | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| Molt-16-a-Cy7  | <u>UGCGUAU</u> CTG <sub>L</sub> XT <u>ACGCCCC</u> -dye          | 7606                       | 7607     | 15.00                             |
| Molt-16-b-Cy7  | <u>AUACUGCGUA</u> TXT <sub>L</sub> G <u>UUACGC</u> -dye         | 7656                       | 7655     | 14.70                             |
| Molt-16-c-Cy7  | <u>UGCGT</u> XT <sub>L</sub> CUG <u>UUACGCCCC</u> -dye          | 7583                       | 7585     | 14.60                             |
| Jurkat-e-Cy7   | <u>GGUGUAGCCA</u> UAXT <sub>L</sub> T <u>AGCCG</u> -dye         | 7734                       | 7738     | 14.75                             |
| Jurkat-f-Cy7   | <u>GGT</u> XT <sub>L</sub> <u>AGCCA</u> UAGUU <u>AGCCG</u> -dye | 7734                       | 7727     | 14.75                             |
| Jurkat-g-Cy7   | <u>GGUGT</u> <sub>L</sub> XG <u>CCA</u> UAGUU <u>AGCCG</u> dye  | 7736                       | 7740     | 14.75                             |
| CCRF-CEM-a-Cy7 | <u>UCT</u> XT <sub>L</sub> <u>CCAAGGCUGCUGGC</u> -dye           | 7646                       | 7648     | 14.60                             |
| CCRF-CEM-b-Cy7 | <u>UCUGT</u> <sub>L</sub> X <u>CCAAGGCUGCUGGC</u> -dye          | 7672                       | 7675     | 14.65                             |
| CCRF-CEM-c-Cy7 | <u>UCUGUCXC</u> <sub>L</sub> <u>AAGGCUGCUGGC</u> dye            | 7672                       | 7678     | 14.65                             |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THPTA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient VII.

### 6.3.6 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.8

#### Stimulation der T-Zellen

Die T-Zellen wurden zuvor unter den Standardbedingungen (Kapitel 6.1.2) kultiviert. Für die Stimulation der Zellen mit 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (PMA) von *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) wurden die Zellen zunächst in einer Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau gezählt und anschließend für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Im neuen Medium (RPMI, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) wurden die Zellen ( $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml) resuspendiert und in 5 ml Schalen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das PMA gelöst in DMSO (20 µM) und das DMSO wurden 6 h, 12 h und 24 h vor der RNA-Isolation zu den Zellen hinzugegeben und die Schalen vorsichtig geschwenkt, um eine homogene Verteilung des DMSO zu gewährleisten. Bis zur RNA-Isolation wurden die Zellen im Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten.

### 6.3.7 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.2.9

#### Auswertmethode mit *ImageJ*

Nachdem die Fluoreszenzbilder in der Reihenfolge BF-, TO-, CB- (Emissionswellenlänge des Propidiumiodids) und Cy7-Kanal vereinigt (*merged stack*) als TIF-Datei abgespeichert wurden, konnte die Bearbeitung der Datei im *ImageJ* erfolgen. Dafür wurde das verbundene Bild (*stack*) mit dem Programm geöffnet und anschließend die Hintergrundfluoreszenz durch das des Makro\_1 entfernt. Die Reihenfolge der Befehle im Makro\_1 ist im Anhang, Kapitel 9.2.9 dargestellt. Die

---

Einstellung des Schwellenwertes (*threshhold*) wurde manuell durchgeführt. Hierfür wurde der Schwellenwert so gesetzt, dass die Zellen vollständig rot eingefärbt waren und mit *apply* bestätigt. Es folgte das Makro\_2, durch welches das TO/Cy7-Verhältnis durch Division des TO- und Cy7-Fluoreszenzbildes in einem zusätzlichen Bild dargestellt wurde. Anschließend konnte die fluoreszente Region in den Zellen manuell umkreist und als Histogramm bzw. Textdatei mit dem TO/CY7-Verhältnis (*ratio*) und Anzahl der Pixel (*Counts*) exportiert werden. Das Verhältnis mit dem ersten detektierten Pixel wurde auf das zuvor in der Küvette gemessene TO/Cy7-Verhältnis im Einzelstrang normiert. Somit wurde eine Hintergrundkorrektur der Fluoreszenz in den Zellen durchgeführt. Anschließend fand die Aufsummierung der TO/Cy7-Werte für jedes Pixel (*Counts*) statt.

#### **Durchführung der Messungen am Durchflusszytometer und Analyse der Ergebnisse mit *FCSalyzer***

Die Elektroporation der T-Zellen wurde analog zu den in Kapitel 6.3.3 beschriebenen Schritten mit 0.5  $\mu\text{M}$  FIT-Sonde durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden  $2 \cdot 10^5$  Zellen in 1 ml RPMI aufgenommen und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Vor dem Einführen in das Durchflusszytometer wurden diese zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml PBS gelöst und vor dem Einsatz im Durchflusszytometer vorsichtig geschüttelt, um die Zellen vor dem Verklumpen bzw. Absetzen zu hindern. Es folgte die Vermessung von 10 000 Zellen in PBS. Die Analyse der exportierten *Accuri*-Datei konnte anschließend mit der *FCSalyzer*-Software ausgewertet werden. Durch das so genannten *gaten* erfolgte die Abgrenzung der bereits toten Zellen von den Lebendenden. Hierbei wurden die lebenden Zellen bzw. die Hauptpopulation manuell eingekreist und die Zellen, die außerhalb dieses Bereichs lagen herausgeschnitten.

Anschließend wurde das *gate*“auf alle Messungen angesetzt und die Ergebnisse als SSC gegen TO und Cy7 gegen TO dargestellt (siehe Anhang 9.2.10).

## 6.4 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3

### 6.4.1 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3.1

#### FISH mit der poly-dT-CB-Sonde

Die folgenden Arbeiten wurden von Dr. Imre Gaspar am EMBL-Heidelberg durchgeführt. Die Ovarien wurden in 2% *p*-Formaldehyd, 0.05% Triton-X100 in PBS zerlegt und für 20 min bei RT fixiert. Anschließend wurden sie mit 2 x IBEX (10 mM HEPES, pH 7.7, 100 mM KCl, mM EDTA und 0.3% Triton-X) gewaschen. Die FIT-Sonden wurden mit einer finalen Konzentration von 0.5  $\mu$ M in IBEX gelöst und die Zellen mit diesen 30 min bei 35 °C inkubiert (50  $\mu$ l/Ovarium). Die Ovarien wurden dann auf ein Deckglas übertragen und mikroskopiert. Dies erfolgte an einem *SP8 TCS* Mikroskop der Firma *Leica* (Wetzlar, Deutschland) unter Verwendung eines 63 x 1.4 NA Wasserobjektivs mit folgenden Fluoreszenzfiltern: TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 514 nm und  $\lambda_{\text{em}}$  = 525 - 575 nm und CB:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 592 nm und  $\lambda_{\text{em}}$  = 605 - 650 nm.

#### Analytische Daten zu Kapitel 4.3.1

**Tabelle 6.4.1.1** Vasa-Sonden mit und ohne 2'-OMe-Bausteine.

| Sonde          | Sequenz, X=Ser(CB)                   | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|----------------|--------------------------------------|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|                |                                      | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| Vasa-1-Mix-O-L | <u>UCUAUUUU</u> CXTC <u>AUUUUUCA</u> | 6308                       | 6308     | 8.75                              |
| Vasa-1-DNA     | TCTATTTTCXTCATTTTCA                  | 5859                       | 5852     | 7.57                              |
| Vasa-2-Mix-O-L | <u>UCCAUUUU</u> CXTT <u>AUUUUUCU</u> | 6299                       | 6300     | 8.91                              |
| Vasa-2-DNA     | TCCATTTTCXTTATTTTCT                  | 5850                       | 5845     | 7.55                              |
| Vasa-3-Mix-O-L | <u>GGCCGCCG</u> UTXT <u>TCCUG</u>    | 5820                       | 5820     | 8.86                              |
| Vasa-3-DNA     | GGCCGCCGTTXTCCTG                     | 5319                       | 5318     | 7.10                              |
| Vasa-4-Mix-O-L | <u>GGAACUAC</u> XTGU <u>UGGGC</u>    | 5903                       | 5903     | 8.59                              |
| Vasa-4-DNA     | GGAAC TACXTGTTGGGC                   | 5416                       | 5414     | 5.56                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient I.

---

### 6.4.2 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3.2

#### FISH mit der IAV-CB-4-L-Sonde

Die folgenden Arbeiten wurden von Dr. Ivan Haralampiev in der AG Herrmann (HU Berlin) durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit 10% Formaldehyd von *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) 10 min fixiert und anschließend mit eiskaltem PBS und 2 x Imidazol-Puffer (0.13 M 1-Methylimidazol, 300 nM Natriumchlorid, pH 8) gewaschen. Um den Verlust der RNA zu erniedrigen wurden die 5'-Phosphatgruppen der RNA zu Aminogruppen fixiert, indem die Zellen 1 h mit 0.16 M 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)Carbodiimid von *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) in Imidazol-Puffer bei RT behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit EDC (+ 0.2% Glycin von *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA)) in PBS gewaschen und mit 70% Ethanol bei 4 °C über Nacht permeabilisiert.

Die Zellen wurden mit 2 x SSC (*Saline-Sodium-Citrate buffer*) von *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland) versetzt und mit 2 mM VRC (*Ribonucleoside Vanadate Complex*) von *New England BioLabs* (Massachusetts, USA) 10 min bei RT behandelt, um die RNase Aktivität zu unterdrücken. Für die FISH-Messungen wurden die Zellen mit 100 nM FIT-Sonde in 2 x SCC Puffer und 10% Formamid von *Merck Millipore* (Darmstadt, Deutschland) bei 37 °C für 3 h inkubiert. Die ungebundenen Sonden wurden durch zweifaches Waschen mit SCC und 10% Formamid entfernt. Daraufgehend wurden die Zellen mit Blocking-Puffer (2 x SCC, 2 mM VRC, 0.2% acetyliertes BSA) für 30 min bei RT behandelt, um unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern, bevor die Zellen mit FITC-konjugierten anti-NP-Antikörpern von *Merck* (Darmstadt, Deutschland) in Blocking-Puffer für 45 min bei RT inkubiert wurden. Die ungebundenen Antikörper wurden durch zweifaches Waschen mit Blocking-Puffer entfernt. Zuletzt wurden die Zellkerne mit DAPI von *Sigma-Aldrich* (Massachusetts, USA) angefärbt und nochmals mit 2 x SCC gewaschen. Die Zellen wurden an einem konfokalem *Laser-Scanning* Mikroskop der Firma *Visitron VisiScope* (Puchheim, Deutschland) und einem 60 x 1.2 Wasserobjektiv mit folgendem Fluoreszenzfilter: CB:  $\lambda_{\text{ex}} = 525/50 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em}} = 600/50 \text{ nm}$  und einer Laserdiode für die NP-FITC = 488 nm und DAPI = 405 nm vermessen.

#### Synthese der Peptide

Die Synthesevorschrift und analytischen Daten der verwendeten Peptide sind in Kapitel 6.2.1 angegeben.



---

### Lebendzell-Bildgebung mit FIT-Sonden-Peptid-Aggregaten in A549-Zellen

Die A549-Zellen wurden einen Tag zuvor in  $\mu$ -slide VL 0.4-Kammern von *Ibidi* (Gräfelfing Deutschland) ausgesät und 8 - 10 h vor der Inkubation mit den Sonden, mit dem Panama Influenza A Virus infiziert. Die Zellen zeigten zu Beginn der Lebendzellexperimente eine Konfluenz von ca. 80% auf. Vorab wurde die **IAV-CB-4-L-Sonde** (20  $\mu$ M) mit den jeweiligen Äquivalenten des verwendeten Moleküls 3 min in PBS geschüttelt. Anschließend wurden die Aggregate auf 1  $\mu$ M der Sondenkonzentration in PBS (30  $\mu$ l) verdünnt und die Zellen über die jeweils angegebene Zeitspanne bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Folgend wurden die Zellen mit 2 x PBS gewaschen und in phenolrotfreiem DMEM bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gemessen.

### Durchführung der Lebendzellexperimente mit Polyglycerol-Amin und anschließendem FISH mit Antikörperfärbung

Folgende Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ivan Haralampiev aus der AG Herrmann (HU Berlin) durchgeführt. Die A549-Zellen wurden einen Tag zuvor in  $\mu$ -slide VL 0.4-Kammern von *Ibidi* (Gräfelfing, Deutschland) ausgesät und 8 - 10 h vor Inkubation mit den Sonden mit dem Panama Influenza A Virus infiziert. Die Zellen zeigten zu Beginn der Lebendzellexperimente eine Konfluenz von ca. 80% auf. Vorab wurde die **IAV-CB-4-L** (20  $\mu$ M) mit 10 Äq. PG-Amin 3 min in PBS geschüttelt. Anschließend wurden die Aggregate auf 0.25  $\mu$ M der Sondenkonzentration in PBS (30  $\mu$ l) verdünnt und die Zellen mit diesen über 30 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und daraufhin mit 3 x PBS gewaschen. Es folgte die Fixierung über 10 min mit 10% Formaldehyd von *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA), Waschen mit eiskaltem PBS und 2 x Imidazol-Puffer (0.13 M 1-Methylimidazol, 300 nM Natriumchlorid, pH 8). Die 5'-Phosphatgruppen der RNA wurden durch die Behandlung mit 0.16 M 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)Carbodiimid von *Sigma-Aldrich* (Saint Louis, USA) für 1 h bei RT in Imidazol-Puffer mit den Aminogruppen immobilisiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit EDC (+0.2% Glycin (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA)) in PBS gewaschen und mit 70% Ethanol bei 4 °C über Nacht permeabilisiert. Die Zellen wurden mit 2 x SSC (*Saline-Sodium-Citrate buffer*) von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) versetzt und mit 2 mM VRC (*Ribonucleoside Vanadate Complex*) von *New England BioLabs* (Massachusetts, USA) 10 min bei RT behandelt um die RNase-Aktivität zu unterdrücken. Darauffolgend wurden die Zellen mit Blocking-Puffer (2 x SSC, 2 mM VRC, 0.2% acetyliertes BSA) für 30 min bei RT behandelt, um unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. Die Zellen wurden mit FITC-konjugierten NP-Antikörpern von *Merck* (Darmstadt, Deutschland) in Blocking-Puffer 45 min bei RT inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch zweifaches Waschen mit dem Blocking-Puffer entfernt.

## 6.4 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3

Zuletzt wurden die Zellkerne mit DAPI von *Sigma-Aldrich* (Massachusetts, USA) angefärbt und nochmals mit 2 x SCC gewaschen. Die Zellen wurden an einem konfokalem *Laser-Scanning* Mikroskop der Firma *Visitron VisiScope* (Puchheim, Deutschland) mit einem 60 x 1.2 Wasserobjektiv mit folgendem Fluoreszenzfilter: CB:  $\lambda_{\text{ex}} = 525/50 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 600/50 \text{ nm}$  und einer Laserdiode für die NP-FITC = 488 nm und DAPI = 405 nm vermessen.

### Analytische Daten zu Kapitel 4.3.2

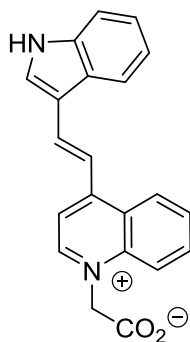
Tabelle 6.4.2.1 IAV-CB-Sonden.

| Sonde      | Sequenz, X=Ser(CB)                      | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|------------|---|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|            |   | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| IAV-CB-3-L | <u>AAAACGACXT<sub>L</sub>TGUUUCUACU</u> | 6817                       | 6817     | 7.55                              |
| IAV-CB-4-L | <u>AAACGACCXT<sub>L</sub>TGUUUCUACU</u> | 6802                       | 6802     | 7.70                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THAP-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient I.

### 6.4.3 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3.3

#### Rot (4)



C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
328.37 g/mol

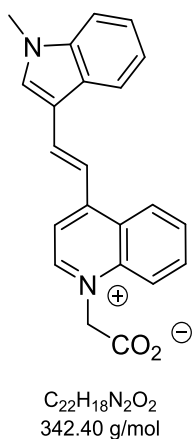
*N*-Carboxymethyllepidin (1.70 g, 6.16 mmol, 1.00 Äq.) und Indol-3-carbaldehyd (2.69 g, 18.4 mmol, 3.00 Äq.) wurden in Ethanol (20 ml) gelöst. Anschließend wurde Piperidin (1.35 ml, 13.5 mmol, 2.20 Äq.) hinzugefügt und das Reaktionsgemisch 19 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur und Entfernen des Lösungsmittels, wurde der Rückstand in Methanol (10 ml) gelöst, in eiskaltem Diethylether (50 ml) gefällt und 3 Tage im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurde der Rückstand abfiltriert und säulenchromatographisch über Kieselgel (2-Propanol/H<sub>2</sub>O/AcOH, 70:29:1, R<sub>f</sub> = 0.36) gereinigt.

Ausbeute: 450 mg, 1.3 mmol, 21%

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm] = 9.01 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1 H, H-Ar), 8.91 (d,  $J$  = 9 Hz, 1 H, H-Ar), 8.46 (d,  $J$  = 15 Hz, 1 H, H-Ar), 8.40 (d,  $J$  = 5 Hz, 1 H, H-Ar), 8.29 – 8.26 (m, 2 H, H-Ar), 8.16 – 8.08 (m, 2 H, H-Ar), 8.01 – 7.82 (m, 2 H, H-Ar), 7.65 – 7.60 (m, 1 H, H-Ar), 7.32 – 7.31 (m, 2 H, H-Ar), 5.13 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ).

$\delta$  [ppm] = 152.67 (C=O), 149.20 (C-Ar), 146.17 (C-Ar), 138.75 (C-Ar), 137.98 (C-Ar), 133.86 (C-Ar), 133.42 (C-Ar), 127.93 (C-Ar), 125.74 (C-Ar), 125.51 (C-Ar), 125.34 (C-Ar), 122.79 (C-Ar), 121.94 (C-Ar), 121.23 (C-Ar), 120.19 (C-Ar), 119.26 (C-Ar), 114.57 (C-Ar), 112.99 (C-Ar), 112.89 (C-Ar), 112.28 (C-Ar), 42.62 ( $\text{CH}_2$ ).

**Methylrot (5)**



1-Methyl-1H-indol-3-carbaldehyd (995 mg, 6.20 mmol, 1.00 Äq.) wurde mit *N*-Carboxymethylpiperidin (2.51 g, 12.4 mmol, 2.00 Äq.) in Ethanol (39 ml) gelöst und mit Piperidin (1.24 ml, 12.4 mmol, 2.00 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 19 h bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde das Gemisch auf Raumtemperatur abgekühlt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Molekül wurde säulenchromatographisch über Kieselgel (2-Butanol/ $\text{H}_2\text{O}$ /AcOH, 80:15:5,  $R_f$  = 0.30) gereinigt.

Ausbeute: 339 mg, 0.98 mmol, 16%

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  [ppm] = 9.03 (d,  $J$  = 10 Hz, 1 H, H-Ar), 8.89 (d,  $J$  = 10 Hz, 1 H, H-Ar), 8.49 – 8.46 (m, 2 H, H-Ar), 8.40 – 8.39 (m, 1 H, H-Ar), 8.31 – 8.28 (m, 2 H, H-Ar), 8.15 – 8.08 (m, 2 H, H-Ar), 7.92 – 7.64 (m, 1 H, H-Ar), 7.41 – 7.35 (m, 3 H, H-Ar), 5.20 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 3.95 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ).

$\delta$  [ppm] = 152.56 (C=O), 146.29 (C-Ar), 145.41 (C-Ar9), 138.72 (C-Ar), 137.03 (C-Ar), 137.03 (C-Ar), 135.66 (C-Ar), 133.92 (C-Ar), 128.03 (C-Ar), 125.87 (C-Ar), 122.99 (C-Ar), 121.58 (C-Ar), 120.33 (C-

## 6.4 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3

Ar), 119.32 (C-Ar), 116.92 (C-Ar), 113.48 (C-Ar), 113.32 (C-Ar), 112.87 (C-Ar), 110.95 (C-Ar), 108.07 (C-Ar), 60.59 (CH<sub>2</sub>), 43.28 (CH<sub>3</sub>).

### Analytische Daten zu Kapitel 4.3.3

**Tabelle 6.4.3.1** BO-DNA-Sonden mit einem LNA-Monomer X<sub>L</sub>.

| Sonde     | Sequenz, X=Ser(BO)                 | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|-----------|------------------------------------|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|           |                                    | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| Test-1-BO | AAATGCTCTXT <sub>L</sub> GTTACTACT | 6216                       | 6219     | 7.80                              |
| Test-2-BO | AAATGCTCTTTXT <sub>L</sub> TACTACT | 6191                       | 6192     | 8.12                              |
| Test-3-BO | AAATGCTXT <sub>L</sub> TTGTTACTACT | 6231                       | 6231     | 8.14                              |
| Test-4-BO | AAAATCTCCXT <sub>L</sub> GCTACTGCT | 6186                       | 6184     | 7.44                              |
| Test-5-BO | AAAATCTCCTTGXT <sub>L</sub> ACTGCT | 6201                       | 6202     | 7.90                              |
| Test-6-BO | AAAATCTCCTTGCTAXT <sub>L</sub> GCT | 6201                       | 6204     | 7.80                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient I.

**Tabelle 6.4.3.2** TO-DNA-Sonden mit einem LNA-Monomer X<sub>L</sub>.

| Sonde     | Sequenz, X=Ser(TO)                 | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|-----------|------------------------------------|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|           |                                    | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| Test-1-TO | AAATGCTCTXT <sub>L</sub> GTTACTACT | 6266                       | 6266     | 8.26                              |
| Test-2-TO | AAATGCTCTTTXT <sub>L</sub> TACTACT | 6241                       | 6241     | 8.55                              |
| Test-3-TO | AAATGCTXT <sub>L</sub> TTGTTACTACT | 6281                       | 6281     | 8.35                              |
| Test-4-TO | AAAATCTCCXT <sub>L</sub> GCTACTGCT | 6236                       | 6236     | 7.45                              |
| Test-5-TO | AAAATCTCCTTGXT <sub>L</sub> ACTGCT | 6251                       | 6252     | 8.05                              |
| Test-6-TO | AAAATCTCCTTGCTAXT <sub>L</sub> GCT | 6251                       | 6252     | 8.06                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient I.

**Tabelle 6.4.3.3** CV-DNA-Sonden mit einem LNA-Monomer X<sub>L</sub>.

| Sonde     | Sequenz, X=Ser(CV)                 | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|-----------|------------------------------------|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|           |                                    | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| Test-1-CV | AAATGCTCTXT <sub>L</sub> GTTACTACT | 6271                       | 6271     | 7.37                              |
| Test-2-CV | AAATGCTCTTTXT <sub>L</sub> TACTACT | 6246                       | 6246     | 7.57                              |
| Test-3-CV | AAATGCTXT <sub>L</sub> TTGTTACTACT | 6286                       | 6285     | 7.45                              |
| Test-4-CV | AAAATCTCCXT <sub>L</sub> GCTACTGCT | 6241                       | 6244     | 7.25                              |
| Test-5-CV | AAAATCTCCTTGXT <sub>L</sub> ACTGCT | 6256                       | 6257     | 7.04                              |
| Test-6-CV | AAAATCTCCTTGCTAXT <sub>L</sub> GCT | 6256                       | 6257     | 7.32                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit HPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient I.

## 6.4 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3

**Tabelle 6.4.3.4** MR-DNA-Sonden mit einem LNA-Monomer X<sub>L</sub>.

| Sonde     | Sequenz, X=Ser(MR)                 | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|-----------|------------------------------------|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|           |                                    | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| Test-1-MR | AAATGCTCTXT <sub>L</sub> GTTACTACT | 6271                       | 6270     | 8.40                              |
| Test-2-MR | AAATGCTCTTTXT <sub>L</sub> TACTACT | 6246                       | 6246     | 8.80                              |
| Test-3-MR | AAATGCTXT <sub>L</sub> TTGTTACTACT | 6286                       | 6285     | 8.68                              |
| Test-4-MR | AAAATCTCCXT <sub>L</sub> GCTACTGCT | 6241                       | 6245     | 8.45                              |
| Test-5-MR | AAAATCTCCTTGXT <sub>L</sub> ACTGCT | 6256                       | 6257     | 8.36                              |
| Test-6-MR | AAAATCTCCTTGCTAXT <sub>L</sub> GCT | 6256                       | 6257     | 8.36                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient I.

**Tabelle 6.4.3.5** Rot-DNA-Sonden mit einem LNA-Monomer X<sub>L</sub>.

| Sonde      | Sequenz, X=Ser(Rot)                | MALDI-TOF-MS <sup>a</sup>  |          | R <sub>T</sub> / min <sup>b</sup> |
|------------|------------------------------------|----------------------------|----------|-----------------------------------|
|            |                                    | berechnet [M] <sup>+</sup> | gefunden |                                   |
| Test-1-Rot | AAATGCTCTXT <sub>L</sub> GTTACTACT | 6257                       | 6257     | 10.8                              |
| Test-2-Rot | AAATGCTCTTTXT <sub>L</sub> TACTACT | 6232                       | 6230     | 11.1                              |
| Test-3-Rot | AAATGCTXT <sub>L</sub> TTGTTACTACT | 6272                       | 6269     | 10.1                              |
| Test-4-Rot | AAAATCTCCXT <sub>L</sub> GCTACTGCT | 6227                       | 6229     | 11.1                              |
| Test-5-Rot | AAAATCTCCTTGXT <sub>L</sub> ACTGCT | 6242                       | 6243     | 10.8                              |
| Test-6-Rot | AAAATCTCCTTGCTAXT <sub>L</sub> GCT | 6242                       | 6243     | 10.8                              |

[a] Shimadzu Axima-Confidence MALDI-TOF-MS mit THPA-Matrix; [b] analytische HPLC-RP-UV, Gradient II.

### 6.4.4 Experimentelle Vorschriften zu Kapitel 4.3.4

Die dazugehörigen Synthesevorschriften sind in der folgenden Arbeit aufgeführt:

Simon Bartsch, *Bachelorarbeit „Synthese von konformativ eingeschränkten PNA-Monomeren für die Erhöhung der Helligkeit von FIT-PNA-Hybridisierungssonden“*, Humbolt-Universität zu Berlin, **2017**.

**Tcyp-TO-PNA-1:** H<sub>2</sub>N-K c a g t t\* Aeg(TO) t t a t g c c g t t g K-NH<sub>2</sub>

C<sub>212</sub>H<sub>269</sub>N<sub>94</sub>O<sub>57</sub>S (5075.09 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+4H]<sup>4+</sup> (m/z) = 1015.82, gefunden (m/z) = 1016.18.

UPLC (03 - 40 % Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 2.10 min.

**Tcyp-TO-PNA-2:** H<sub>2</sub>N-K c a g t t a Aeg(TO) t\* a t g c c g t t g K-NH<sub>60</sub><sub>2</sub>

C<sub>212</sub>H<sub>268</sub>N<sub>97</sub>O<sub>55</sub>S (5084.67 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+4H]<sup>4+</sup> (m/z) = 1017.73, gefunden (m/z) = 1017.78.

UPLC (03 - 40 % Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 2.06 min.

**Tcyp-TO-PNA-3:** H<sub>2</sub>N-K c a g t t a\* Aeg(TO) a t g c c g t t g K-NH<sub>2</sub>

C<sub>212</sub>H<sub>268</sub>N<sub>97</sub>O<sub>55</sub>S (5084.67 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+4H]<sup>4+</sup> (m/z) = 1017.73, gefunden (m/z) = 1017.33.

UPLC (03 - 40 % Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 2.07 min

**Tcyp-TO-PNA-4:** H<sub>2</sub>N-K c a g t t a t t Aeg(TO) t\* g c c g t t g K-NH<sub>2</sub>

C<sub>212</sub>H<sub>269</sub>N<sub>94</sub>O<sub>57</sub>S (5075.09 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+4H]<sup>4+</sup> (m/z) = 1015.82, gefunden (m/z) = 1015.43.

UPLC (03 - 40 % Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 2.04 min.

**Tcyp-TO-PNA-5:** H<sub>2</sub>N-K c a g t t a t t a t\* Aeg(TO) c c g t t g K-NH<sub>2</sub>

C<sub>212</sub>H<sub>269</sub>N<sub>94</sub>O<sub>57</sub>S (5059.66 g/mol)

ESI-MS: berechnet für [M+4H]<sup>4+</sup> (m/z) = 1012.74, gefunden (m/z) = 1018.33.

UPLC (03 - 40 % Laufmittel B in 4 min): t<sub>R</sub> = 2.12 min.

---

## 7. Abkürzungsverzeichnis

|        |  |
|--------|--|
| 2'-OMe | 2'-O-Methyl-RNA                                    |
| ACN    | Acetonitril  |
| Äq.    | Äquivalente  |
| aq.    | „in wässriger Lösung“                              |
| ATP    | Adenosintriphosphat                                |
| a.u.   | <i>arbitrary unit</i> (willkürliche Einheit)       |
| BO     | Thiazolgelb  |
| Boc    | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl                      |
| Bhoc   | Benzhydryloxycarbonyl                              |
| Br     | <i>brightness</i> (Helligkeit)                     |
| c      | Konzentration                                      |
| calc.  | <i>calculated</i> (errechnet)                      |
| Cbz    | Benzyloxycarbonyl                                  |
| cDNA   | <i>complementary</i> DNA                           |
| CPP    | <i>cell penetrating peptide</i>                    |
| CuAAC  | <i>copper catalysed alkyne azide cycloaddition</i> |
| Cy7    | Cyanin-7   |
| DAPI   | 4'-6-Diamidin-2-Phenylindol                        |
| DC     | Dünnschichtchromatographie                         |
| DCM    | Dichlormethan                                      |
| DIPEA  | Diisopropylethylamin                               |
| DMEM   | <i>dulbecco's modified eagle medium</i>            |
| DMF    | Dimethylformamid                                   |
| DMSO   | Dimethylsulfoxid                                   |
| DMTr   | Dimethoxytrityl                                    |
| DNA    | Desoxyribonukleinsäure                             |
| DPBS   | <i>dulbecco's phosphate buffered saline</i>        |
| ds     | Doppelstrang                                       |
| e      | Extinktionskoeffizient                             |
| em     | Emission   |

## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

|                |   |
|----------------|---|
| <i>et. al.</i> | <i>et alii</i> (und andere)   |
| EtOAc          | Ehtylacetat   |
| Ex             | <i>excitation</i> (Anregung)  |
| FAM            | 5,6-Carboxyfluorescein  |
| FBS            | <i>fetal bovine serum</i> (fetales Kälberserum)   |
| FISH           | Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung   |
| FIT            | <i>forced intercalation</i> (erzwungene Interkalation)                                      |
| Fmoc           | Fluorenylmethoxycarbonyl  |
| gef            | gefunden  |
| ges            | gesucht   |
| h              | Stunde  |
| HCTU           | 2-(6-Chlor-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium-<br>hexafluorophosphat |
| HPA            | Hydroxypicolinsäure   |
| HPLC           | <i>high performance liquid chromatography</i>   |
| I              | Fluoreszenzintensität   |
| IR             | Infrarot  |
| l              | Wellenlänge   |
| LNA            | <i>locked nucleic acid</i>  |
| MALDI-TOF      | <i>matrix assisted laser desorption / ionisation – time of flight</i>                       |
| max            | maximal   |
| MB             | <i>molecular beacon</i>   |
| MBHA           | 4-Methylbenzylhydrylaminhydrochlorid  |
| min            | Minuten   |
| Mmt            | Methoxytrityl-[(4-methoxyphenyl)diphenylmehtyl]   |
| MR             | Methylrot   |
| mRNA           | <i>messenger RNA</i>  |
| MS             | Massenspektrometrie   |
| nm             | Nanometer   |
| NMM            | <i>N</i> -Methylmorpholin   |
| NMR            | <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>  |
| NP             | Nukleoprotein   |
| nt             | Nukleotid   |



## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

|                |  |
|----------------|--|
| PBS            | <i>phosphate buffered saline</i>                                     |
| PCR            | Polymerasekettenreaktion   |
| PEG            | Polyethylenglycol  |
| pH             | <i>potentia Hydrogenii</i>   |
| PNA            | <i>peptide nucleic acid</i>  |
| PPTS           | Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat                              |
| PyBOP          | Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium<br>hexafluorophosphat |
| R              | Rot  |
| R <sub>f</sub> | Retentionsfaktor   |
| RNA            | Ribonukleinsäure   |
| s              | Sekunde  |
| Slit           | Schlitzbreite des Fluoreszenzspektrometers                           |
| SPPS           | <i>solid phase peptide synthesis</i>                                 |
| ss             | <i>single strand</i> (Einzelstrang)                                  |
| svRNA          | <i>small</i> virale RNA  |
| TCEP           | Tris(2-carboxyethyl)phosphan   |
| TFA            | Trifluoressigsäure   |
| TIF            | <i>tagged image file</i>   |
| TIS            | Triisopropylsilan  |
| T <sub>M</sub> | Schmelztemperatur  |
| TO             | Thiazolorange  |
| Tris           | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                      |
| Trt            | Trityl   |
| UPLC           | <i>ultra performance liquid chromatography</i>                       |
| vRNA           | virale RNA   |
| vRNP           | virales Nukleoprotein  |

---

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 16793-16797.
- [2] a) P. A. Levene, *Journal of Biological Chemistry* **1919**, *40*, 415-424; b) O. T. Avery, C. M. Macleod, M. McCarty, *J Exp Med* **1944**, *79*, 137-158; c) J. D. Watson, F. H. Crick, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1953**, *18*, 123-131; d) M. P. Stewart, R. Langer, K. F. Jensen, *Chem Rev* **2018**, *118*, 7409-7531.
- [3] F. Hovelmann, I. Gaspar, S. Loibl, E. A. Ermilov, B. Roder, J. Wengel, A. Ephrussi, O. Seitz, *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, *53*, 11370-11375.
- [4] M. D. Blower, *Int Rev Cell Mol Biol* **2013**, *302*, 1-39.
- [5] I. Haralampiev, M. Schade, J. Chamiolo, F. Jolmes, S. Prisner, P. T. Witkowski, M. Behrent, F. Hovelmann, T. Wolff, O. Seitz, A. Herrmann, *Chembiochem* **2017**, *18*, 1589-1592.
- [6] M. Sultan, M. H. Schulz, H. Richard, A. Magen, A. Klingenhoff, M. Scherf, M. Seifert, T. Borodina, A. Soldatov, D. Parkhomchuk, D. Schmidt, S. O'Keeffe, S. Haas, M. Vingron, H. Lehrach, M. L. Yaspo, *Science* **2008**, *321*, 956-960.
- [7] a) G. M. Fang, J. Chamiolo, S. Kankowski, F. Hovelmann, D. Friedrich, A. Lower, J. C. Meier, O. Seitz, *Chem Sci* **2018**, *9*, 4794-4800; b) R. Hiesel, B. Wissinger, W. Schuster, A. Brennicke, *Science* **1989**, *246*, 1632-1634.
- [8] a) I. G. Felix Hövelmann, Jasmine Chamiolo, Marc Kasper, Jonas Steffen, Anne Ephrussi, Oliver Seitz, *Chemical Science* **2016**, *7*, 128--135; b) S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew Chem Int Edit* **2011**, *50*, 1931-1934.
- [9] Y. T. Chow, S. Chen, R. Wang, C. Liu, C. W. Kong, R. A. Li, S. H. Cheng, D. Sun, *Sci Rep* **2016**, *6*, 24127.
- [10] H. Potter, R. Heller, *Curr Protoc Mol Biol* **2010**, *Chapter 9*, Unit9 3.
- [11] G. Radis-Baptista, I. S. Campelo, J. R. L. Morlighem, L. M. Melo, V. J. F. Freitas, *J Biotechnol* **2017**, *252*, 15-26.
- [12] I. Walev, S. C. Bhakdi, F. Hofmann, N. Djonder, A. Valeva, K. Aktories, S. Bhakdi, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 3185-3190.
- [13] B. Chen, L. A. Gilbert, B. A. Cimini, J. Schnitzbauer, W. Zhang, G. W. Li, J. Park, E. H. Blackburn, J. S. Weissman, L. S. Qi, B. Huang, *Cell* **2013**, *155*, 1479-1491.
- [14] A. Ettinger, T. Wittmann, *Methods Cell Biol* **2014**, *123*, 77-94.
- [15] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie, Vol. 5. Auflage*, WILEY-VCH, Weinheim, **2004**.
- [16] A. Jablonski, *Nature* **1933**, *131*, 839-840.
- [17] a) S. Ikeda, A. Okamoto, *Chem Asian J* **2008**, *3*, 958-968; b) D. W. Cho, M. Fujitsuka, K. H. Choi, M. J. Park, U. C. Yoon, T. Majima, *J Phys Chem B* **2006**, *110*, 4576-4582.
- [18] R. McGuire, I. Feldman, *Biopolymers* **1975**, *14*, 1095-1102.
- [19] a) L. Bethge, I. Singh, O. Seitz, *Org Biomol Chem* **2010**, *8*, 2439-2448; b) O. Kohler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Chembiochem* **2005**, *6*, 69-77; c) G. L. Silva, V. Ediz, D. Yaron, B.A. Armitage, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 5710-5718.
- [20] J. Kurreck, *Eur J Biochem* **2003**, *270*, 1628-1644.
- [21] V. V. Demidov, *Trends Biotechnol* **2003**, *21*, 4-7.
- [22] K. A. Gallo, K. L. Shao, L. R. Phillips, J. B. Regan, M. Koziolkiewicz, B. Uznanski, W. J. Stec, G. Zon, *Nucleic Acids Res* **1986**, *14*, 7405-7420.
- [23] K. Nagahama, R. N. Veedu, J. Wengel, *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 2707-2709.
- [24] H. P. Vosberg, F. Eckstein, *J Biol Chem* **1982**, *257*, 6595-6599.
- [25] E. Socher, *Dissertation*, Humboldt-Universität zu Berlin **2010**.

## 8. Literaturverzeichnis

- 
- [26] a) M. Majlessi, N. C. Nelson, M. M. Becker, *Nucleic Acids Res* **1998**, *26*, 2224-2229; b) C. Molenaar, S. A. Marras, J. C. Slats, J. C. Truffert, M. Lemaitre, A. K. Raap, R. W. Dirks, H. J. Tanke, *Nucleic Acids Res* **2001**, *29*, E89-89.
  - [27] B. Vester, J. Wengel, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13233-13241.
  - [28] A. N. Silahatoglu, N. Tommerup, H. Vissing, *Mol Cell Probes* **2003**, *17*, 165-169.
  - [29] J. Kurreck, E. Wyszko, C. Gillen, V. A. Erdmann, *Nucleic Acids Res* **2002**, *30*, 1911-1918.
  - [30] M. K. Schlegel, A. E. Peritz, K. Kittigowittana, L. Zhang, E. Meggers, *Chembiochem* **2007**, *8*, 927-932.
  - [31] P. E. Nielsen, M. Egholm, *Curr Issues Mol Biol* **1999**, *1*, 89-104.
  - [32] P. E. Nielsen, *Orig Life Evol Biosph* **1993**, *23*, 323-327.
  - [33] M. H. Caruthers, G. Beaton, J. V. Wu, W. Wiesler, *Methods Enzymol* **1992**, *211*, 3-20.
  - [34] **2018**.
  - [35] C. D. Claeboue, R. Gao, S. M. Hecht, *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 5685-5691.
  - [36] B. H. Dahl, J. Nielsen, O. Dahl, *Nucleic Acids Res* **1987**, *15*, 1729-1743.
  - [37] R. B. Merrifield, *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1969**, *32*, 221-296.
  - [38] F. Beck, *Methods Mol Biol* **2002**, *208*, 29-41.
  - [39] a) T. Mei, X. Lu, N. Sun, X. Li, J. Chen, M. Liang, X. Zhou, Z. Fang, *J Pharm Biomed Anal* **2018**, *158*, 204-208; b) P. Y. Kwok, *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2001**, *2*, 235-258; c) B. J. Anderson, C. Larkin, K. Guja, J. F. Schilbach, *Methods Enzymol* **2008**, *450*, 253-272.
  - [40] a) J. A. McNeil, C. V. Johnson, K. C. Carter, R. H. Singer, J. B. Lawrence, *Genet Anal Tech Appl* **1991**, *8*, 41-58; b) J. M. Levsky, R. H. Singer, *J Cell Sci* **2003**, *116*, 2833-2838.
  - [41] a) J. Li, J. Huang, X. Yang, Y. Yang, K. Quan, N. Xie, Y. Wu, C. Ma, K. Wang, *Nanotheranostics* **2018**, *2*, 96-105; b) P. J. Santangelo, B. Nix, A. Tsourkas, G. Bao, *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, e57.
  - [42] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat Biotechnol* **1996**, *14*, 303-308.
  - [43] G. Goel, A. Kumar, A. K. Puniya, W. Chen, K. Singh, *J Appl Microbiol* **2005**, *99*, 435-442.
  - [44] R. Manganelli, S. Tyagi, I. Smith, *Methods Mol Med* **2001**, *54*, 295-310.
  - [45] a) P. Conlon, C. J. Yang, Y. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. Kim, N. Stevens, A. A. Marti, S. Jockusch, N. J. Turro, W. Tan, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 336-342; b) C. Wu, C. Wang, L. Yan, C. J. Yang, *J Biomed Nanotechnol* **2009**, *5*, 495-504.
  - [46] S. Tyagi, S. A. Marras, F. R. Kramer, *Nat Biotechnol* **2000**, *18*, 1191-1196.
  - [47] X. Zhang, Y. Song, A. Y. Shah, V. Lekova, A. Raj, L. Huang, M. A. Behlke, A. Tsourkas, *Nucleic Acids Res* **2013**, *41*, e152.
  - [48] A. K. Chen, O. Davydenko, M. A. Behlke, A. Tsourkas, *Nucleic Acids Res* **2010**, *38*, e148.
  - [49] N. Venkatesan, Y. J. Seo, B. H. Kim, *Chem Soc Rev* **2008**, *37*, 648-663.
  - [50] J. Lee, S. U. Moon, Y. S. Lee, B. A. Ali, A. A. Al-Khedhairi, D. Ali, J. Ahmed, A. M. Al Salem, S. Kim, *Sensors (Basel)* **2015**, *15*, 12872-12883.
  - [51] A. Okamoto, *Chem Soc Rev* **2011**, *40*, 5815-5828.
  - [52] T. Kubota, S. Ikeda, H. Yanagisawa, M. Yuki, A. Okamoto, *Bioconjug Chem* **2009**, *20*, 1256-1261.
  - [53] a) F. Hövelmann, *Dissertation*, Humboldt-Universität zu Berlin **2014**; b) S. Ikeda, H. Yanagisawa, A. Nakamura, D. O. Wang, M. Yuki, A. Okamoto, *Org Biomol Chem* **2011**, *9*, 4199-4204.
  - [54] C. Holzhauser, H. A. Wagenknecht, *J Org Chem* **2013**, *78*, 7373-7379.
  - [55] C. Holzhauser, R. Liebl, A. Goepferich, H. A. Wagenknecht, M. Breunig, *ACS Chem Biol* **2013**, *8*, 890-894.
  - [56] E. Socher, D. V. Jarikote, A. Knoll, L. Roglin, J. Burmeister, O. Seitz, *Anal Biochem* **2008**, *375*, 318-330.
  - [57] L. Bethge, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 114-125.
  - [58] E. Socher, A. Knoll, O. Seitz, *Org Biomol Chem* **2012**, *10*, 7363-7371.
  - [59] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams, *Genome Res* **1996**, *6*, 986-994.

## 8. Literaturverzeichnis

- 
- [60] N. Nitin, P. J. Santangelo, G. Kim, S. M. Nie, G. Bao, *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*.
  - [61] A. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, R. H. Singer, *Science* **1998**, *280*, 585-590.
  - [62] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew Chem Int Edit* **1999**, *38*, 2865-2869.
  - [63] a) T. L. Halo, K. M. McMahon, N. L. Angeloni, Y. Xu, W. Wang, A. B. Chinen, D. Malin, E. Strekalova, V. L. Cryns, C. Cheng, C. A. Mirkin, C. S. Thaxton, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 17104-17109; b) V. Vijayanathan, T. Thomas, T. J. Thomas, *Biochemistry* **2002**, *41*, 14085-14094.
  - [64] H. M. Choi, V. A. Beck, N. A. Pierce, *ACS Nano* **2014**, *8*, 4284-4294.
  - [65] W. E. Briley, M. H. Bondy, P. S. Randeria, T. J. Dupper, C. A. Mirkin, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 9591-9595.
  - [66] X. He, T. Zeng, Z. Li, G. Wang, N. Ma, *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 3073-3076.
  - [67] P. G. Stockley, N. J. Stonehouse, J. B. Murray, S. T. Goodman, S. J. Talbot, C. J. Adams, L. Liljas, K. Valegard, *Nucleic Acids Res* **1995**, *23*, 2512-2518.
  - [68] S. Tyagi, *Nat Methods* **2009**, *6*, 331-338.
  - [69] J. S. Paige, K. Y. Wu, S. R. Jaffrey, *Science* **2011**, *333*, 642-646.
  - [70] J. Zhang, J. Fei, B. J. Leslie, K. Y. Han, T. E. Kuhlman, T. Ha, *Sci Rep* **2015**, *5*, 17295.
  - [71] M. S. Al-Dosari, X. Gao, *Aaps J* **2009**, *11*, 671-681.
  - [72] Z. Zhang, S. Qiu, X. Zhang, W. Chen, *BMC Biotechnol* **2018**, *18*, 4.
  - [73] A. Sharei, N. Cho, S. Mao, E. Jackson, R. Poceviciute, A. Adamo, J. Zoldan, R. Langer, K. F. Jensen, *J Vis Exp* **2013**, e50980.
  - [74] Y. Zhang, L. C. Yu, *Bioessays* **2008**, *30*, 606-610.
  - [75] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 7413-7417.
  - [76] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 7297-7301.
  - [77] I. Martin, M. Teixeira, E. Giralt, *ChemBiochem* **2011**, *12*, 896-903.
  - [78] J. C. LeCher, S. J. Nowak, J. L. McMurry, *Biomol Concepts* **2017**, *8*, 131-141.
  - [79] V. S. Trubetskoy, J. A. Wolff, V. G. Budker, *Biophys J* **2003**, *84*, 1124-1130.
  - [80] K. A. Mislick, J. D. Baldeschwieler, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 12349-12354.
  - [81] A. Akinc, M. Thomas, A. M. Klibanov, R. Langer, *J Gene Med* **2005**, *7*, 657-663.
  - [82] M. Arzanlou, S. Bohlooli, *J Med Microbiol* **2010**, *59*, 1044-1049.
  - [83] J. Sambrook, D. W. Russell, *CSH Protoc* **2006**, 2006.
  - [84] E. Hoffmann, G. Neumann, Y. Kawaoka, G. Hobom, R. G. Webster, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97*, 6108-6113.
  - [85] G. Guidotti, L. Brambilla, D. Rossi, *Trends Pharmacol Sci* **2017**, *38*, 406-424.
  - [86] Y. Nakamura, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima, *J Control Release* **2007**, *119*, 360-367.
  - [87] R. E. Clark, J. Grzybowski, C. M. Broughton, N. T. Pender, D. G. Spiller, C. G. Brammer, R. V. Giles, D. M. Tidd, *Bone Marrow Transplant* **1999**, *23*, 1303-1308.
  - [88] J. L. Young, D. A. Dean, *Adv Genet* **2015**, *89*, 49-88.
  - [89] a) M. Wang, B. Yin, H. Y. Wang, R. F. Wang, *Immunotherapy* **2014**, *6*, 1265-1278; b) M. T. Bethune, A. V. Joglekar, *Curr Opin Biotechnol* **2017**, *48*, 142-152.
  - [90] P. R. Bohlander, H. A. Wagenknecht, *Org Biomol Chem* **2013**, *11*, 7458-7462.
  - [91] a) J. K. Pokorski, M. A. Witschi, B. L. Purnell, D. H. Appella, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 15067-15073; b) M. C. Myers, M. A. Witschi, N. V. Larionova, J. M. Franck, R. D. Haynes, T. Hara, A. Grajkowski, D. H. Appella, *Org Lett* **2003**, *5*, 2695-2698.
  - [92] K. Ainger, D. Avossa, F. Morgan, S. J. Hill, C. Barry, E. Barbarese, J. H. Carson, *J Cell Biol* **1993**, *123*, 431-441.
  - [93] T. Lehto, K. Ezzat, M. J. A. Wood, S. El Andaloussi, *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *106*, 172-182.
  - [94] M. P. Devatha P. Nair, Shunsuke Chatani, Tao Gong, Weixian Xi, Christopher R. Fenoli, Christopher N. Bowman, *Chemistry of Materials* **2014**, *26*, 724-744.
  - [95] E. Dupont, A. Prochiantz, A. Joliot, *Methods Mol Biol* **2015**, *1324*, 29-37.
  - [96] M. Pooga, M. Hallbrink, M. Zorko, U. Langel, *FASEB J* **1998**, *12*, 67-77.

## 8. Literaturverzeichnis

- 
- [97] M. C. Morris, L. Chaloin, M. Choob, J. Archdeacon, F. Heitz, G. Divita, *Gene Ther* **2004**, *11*, 757-764.
  - [98] a) M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat Biotechnol* **2001**, *19*, 1173-1176; b) M. C. Morris, P. Vidal, L. Chaloin, F. Heitz, G. Divita, *Nucleic Acids Res* **1997**, *25*, 2730-2736.
  - [99] M. Hellmund, H. Zhou, O. Samsonova, P. Welker, T. Kissel, R. Haag, *Macromol Biosci* **2014**, *14*, 1215-1221.
  - [100] H. Margus, K. Padari, M. Pooga, *Mol Ther* **2012**, *20*, 525-533.
  - [101] <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/anthozoafps.html/>, **2019**.
  - [102] a) P. Lonn, A. D. Kacsinta, X. S. Cui, A. S. Hamil, M. Kaulich, K. Gogoi, S. F. Dowdy, *Sci Rep* **2016**, *6*, 32301; b) A. El-Sayed, S. Futaki, H. Harashima, *Aaps J* **2009**, *11*, 13-22.
  - [103] [http://biorad-ads.com/transfection\\_protocols/](http://biorad-ads.com/transfection_protocols/), **2019**.
  - [104] a) T. Garcia-Sanchez, B. Sanchez-Ortiz, I. Vila, M. Guitart, J. Rosell, A. M. Gomez-Foix, R. Bragos, *J Membr Biol* **2012**, *245*, 617-624; b) X. Xu, D. Gao, P. Wang, J. Chen, J. Ruan, J. Xu, X. Xia, *Sci Rep* **2018**, *8*, 11649; c) F. Yamauchi, K. Kato, H. Iwata, *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, e187.
  - [105] E. B. Babiychuk, K. Monastyrskaya, S. Potez, A. Draeger, *Cell Death Differ* **2011**, *18*, 80-89.
  - [106] a) L. Song, R. S. Jope, *Neurosci Lett* **2006**, *402*, 205-209; b) K. A. Spriggs, M. Bushell, A. E. Willis, *Mol Cell* **2010**, *40*, 228-237.
  - [107] F. Hovelmann, I. Gaspar, A. Ephrussi, O. Seitz, *J Am Chem Soc* **2013**, *135*, 19025-19032.
  - [108] W. J. Rhee, G. Bao, *BMC Biotechnol* **2009**, *9*, 30.
  - [109] a) I. E. Catrina, S. A. Marras, D. P. Bratu, *ACS Chem Biol* **2012**, *7*, 1586-1595; b) A. K. Chen, M. A. Behlke, A. Tsourkas, *Nucleic Acids Res* **2008**, *36*, e69; c) X. Wu, S. Mao, Y. Yang, M. N. Rushdi, C. J. Krueger, A. K. Chen, *Nucleic Acids Res* **2018**, *46*, e80.
  - [110] H. Y. Yeh, M. V. Yates, A. Mulchandani, W. Chen, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 17522-17525.
  - [111] G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, R. D. Schreiber, *Nat Immunol* **2002**, *3*, 991-998.
  - [112] a) H. C. Ertl, J. Zaia, S. A. Rosenberg, C. H. June, G. Dotti, J. Kahn, L. J. Cooper, J. Corrigan-Curay, S. E. Strome, *Cancer Res* **2011**, *71*, 3175-3181; b) M. Kalos, B. L. Levine, D. L. Porter, S. Katz, S. A. Grupp, A. Bagg, C. H. June, *Sci Transl Med* **2011**, *3*, 95ra73.
  - [113] a) C. H. June, R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, M. C. Milone, *Science* **2018**, *359*, 1361-1365; b) H. Almasbak, T. Aarvak, M. C. Vemuri, *J Immunol Res* **2016**, *2016*, 5474602.
  - [114] S. L. Maude, N. Frey, P. A. Shaw, R. Aplenc, D. M. Barrett, N. J. Bunin, A. Chew, V. E. Gonzalez, Z. Zheng, S. F. Lacey, Y. D. Mahnke, J. J. Melenhorst, S. R. Rheingold, A. Shen, D. T. Teachey, B. L. Levine, C. H. June, D. L. Porter, S. A. Grupp, *N Engl J Med* **2014**, *371*, 1507-1517.
  - [115] a) R. D. Barber, D. W. Harmer, R. A. Coleman, B. J. Clark, *Physiol Genomics* **2005**, *21*, 389-395; b) A. K. White, K. A. Heyries, C. Doolin, M. Vaninsberghe, C. L. Hansen, *Anal Chem* **2013**, *85*, 7182-7190; c) B. Kozera, M. Rapacz, *J Appl Genet* **2013**, *54*, 391-406.
  - [116] I. Gaspar, F. Hovelmann, J. Chamiolo, A. Ephrussi, O. Seitz, *ACS Chem Biol* **2018**, *13*, 742-749.
  - [117] D. J. Noonan, N. Isakov, A. N. Theofilopoulos, F. J. Dixon, A. Altman, *Eur J Immunol* **1987**, *17*, 803-807.
  - [118] a) B. M. Wile, K. Ban, Y. S. Yoon, G. Bao, *Nat Protoc* **2014**, *9*, 2411-2424; b) C. Yee, J. A. Thompson, D. Byrd, S. R. Riddell, P. Roche, E. Celis, P. D. Greenberg, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 16168-16173.
  - [119] N. C. Dubois, A. M. Craft, P. Sharma, D. A. Elliott, E. G. Stanley, A. G. Elefanty, A. Gramolini, G. Keller, *Nat Biotechnol* **2011**, *29*, 1011-1018.
  - [120] H. M. Larsson, S. T. Lee, M. Roccio, D. Velluto, M. P. Lutolf, P. Frey, J. A. Hubbell, *PLoS One* **2012**, *7*, e49874.
  - [121] K. Ban, B. Wile, S. Kim, H. J. Park, J. Byun, K. W. Cho, T. Saafir, M. K. Song, S. P. Yu, M. Wagner, G. Bao, Y. S. Yoon, *Circulation* **2013**, *128*, 1897-1909.
  - [122] M. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, M. D. Bootman, *Cold Spring Harb Protoc* **2014**, *2014*, pdb top071795.

## 8. Literaturverzeichnis

---

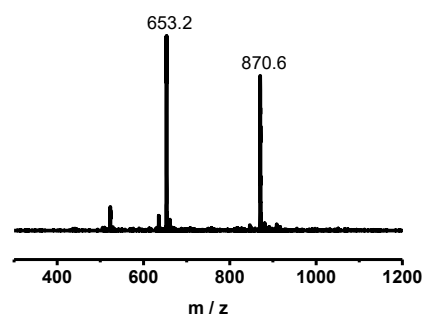
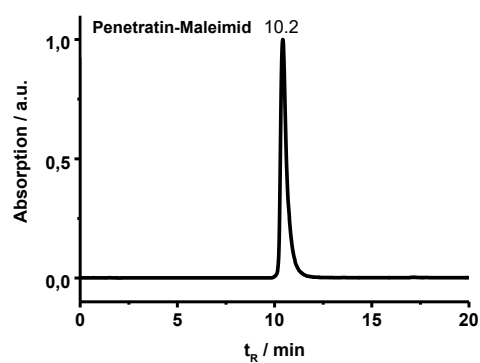
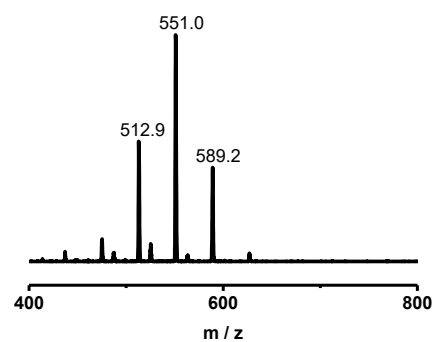
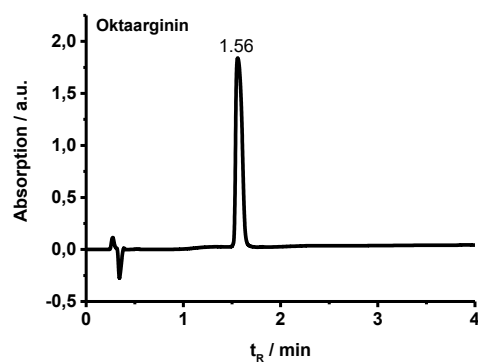
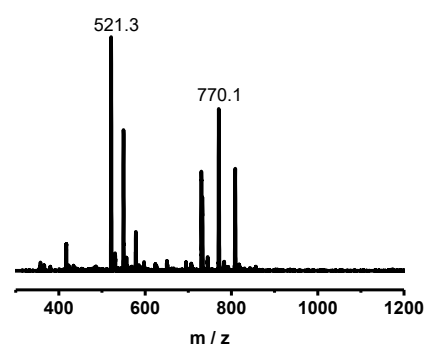
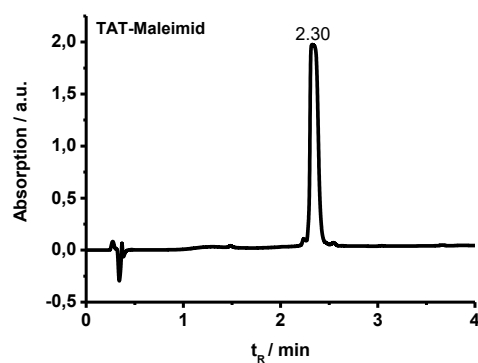
- [123] a) N. M. Bouvier, P. Palese, *Vaccine* **2008**, *26 Suppl 4*, D49-53; b) <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>, **2018**.
- [124] M. A. Chua, S. Schmid, J. T. Perez, R. A. Langlois, B. R. Tenover, *Cell Rep* **2013**, *3*, 23-29.
- [125] J. Steffen, *Masterarbeit*, Humboldt-Universität zu Berlin **2014**.
- [126] P. R. Bohlander, H. A. Wagenknecht, *Methods Appl Fluoresc* **2015**, *3*, 044003.
- [127] S. Bartsch, *Bachelorarbeit*, Humboldt-Universität zu Berlin **2016**.
- [128] R. Lartia, U. Asseline, *Chemistry* **2006**, *12*, 2270-2281.
- [129] a) T. Vilaivan, G. Lowe, *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 9326-9327; b) M. Moccia, M. F. Adamo, M. Saviano, *Artif DNA PNA XNA* **2014**, *5*, e1107176.
- [130] <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006217A.pdf>, **2019**.
- [131] [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/neon\\_device\\_man.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/neon_device_man.pdf), **2019**.
- [132] [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/neon\\_device\\_qrc.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/neon_device_qrc.pdf), **2019**.

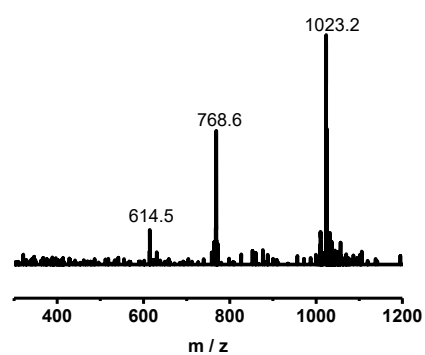
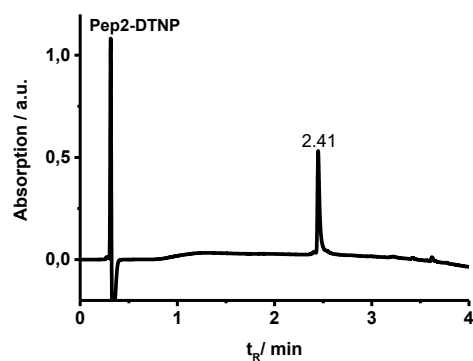
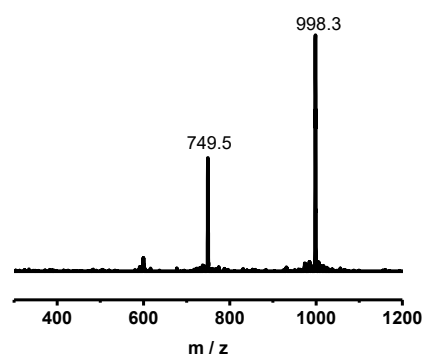
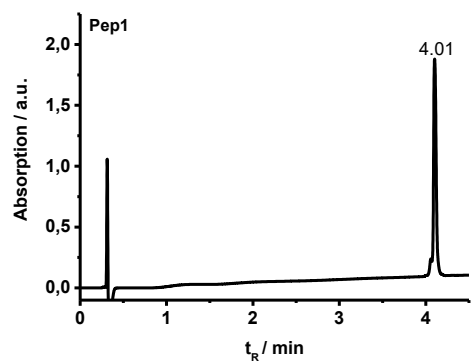
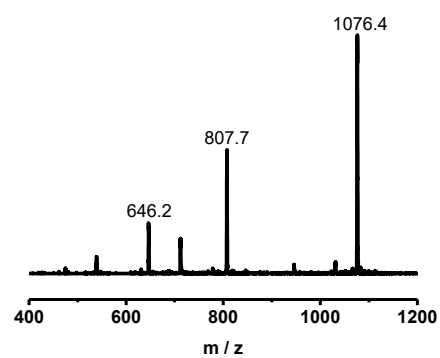
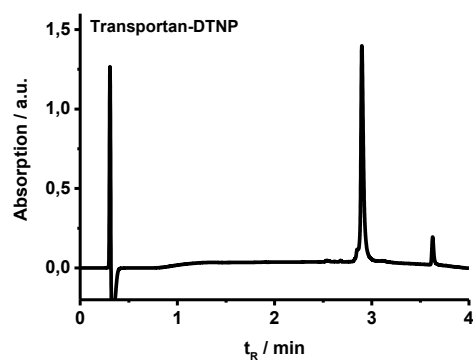
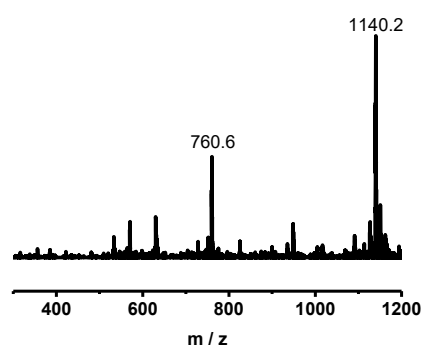
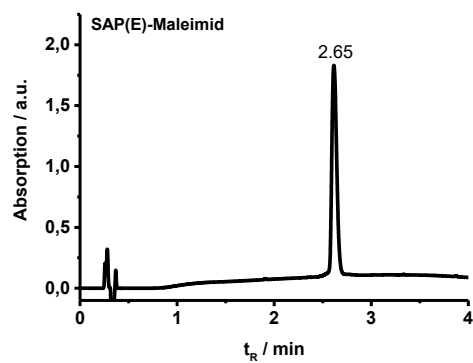
## 9. Anhang

### 9.1 Anhang zu Kapitel 4.1

#### 9.1.1 Anhang zu Kapitel 4.1.1

#### Chromatogramme und Massenspektren der hergestellten Peptide







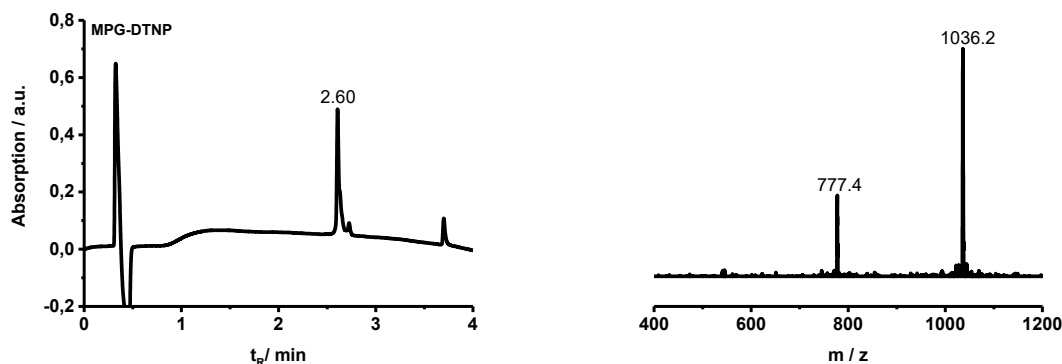


Abbildung 9.1.1.1 RP-HPLC-UV (links) und ESI-MS (rechts).

## 9.1.2 Anhang zu Kapitel 4.1.2 und Kapitel 4.1.3

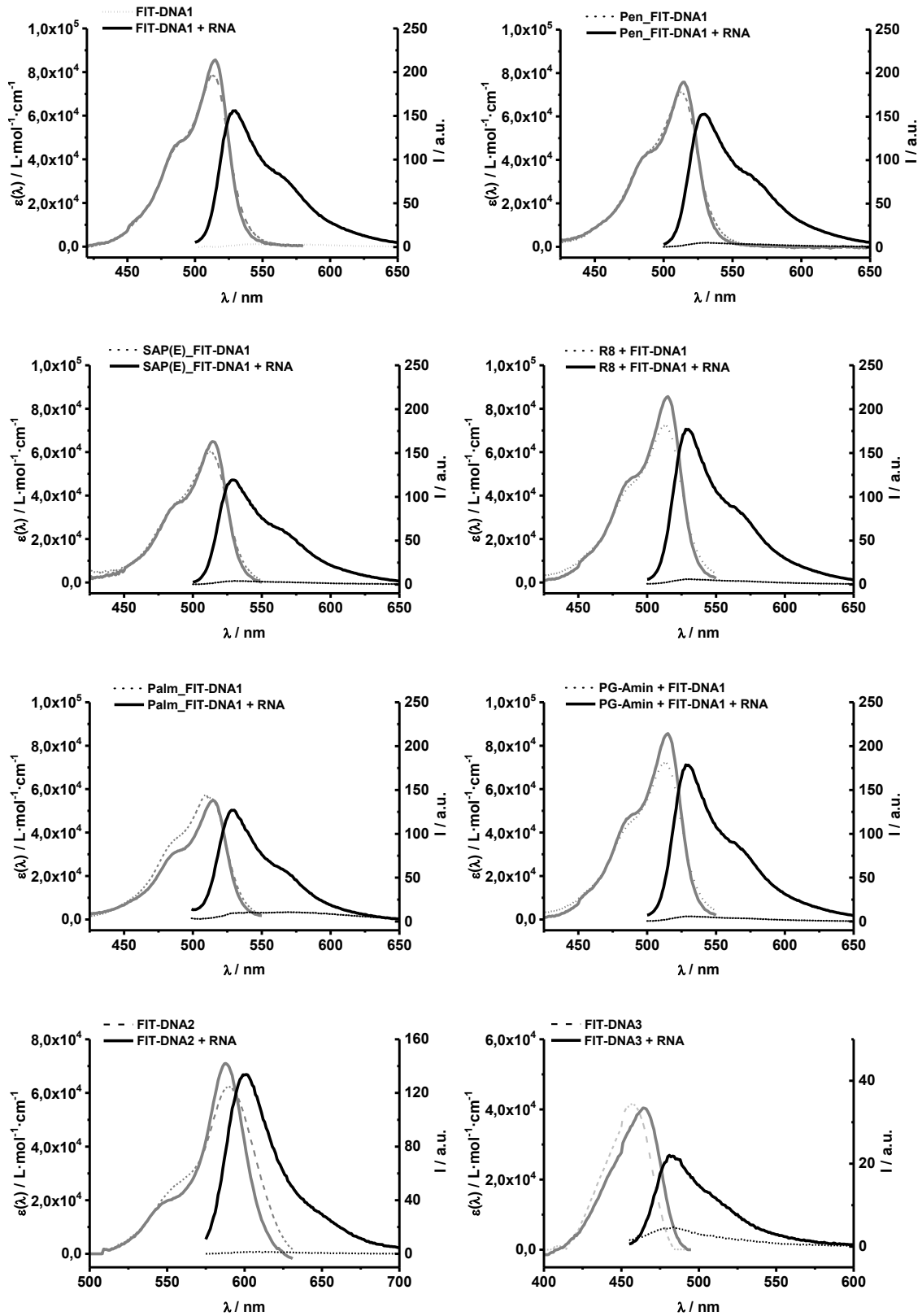
### Fluoreszenzdaten der FIT-Sonden und FIT-Sonden-Konjugate/Aggregate

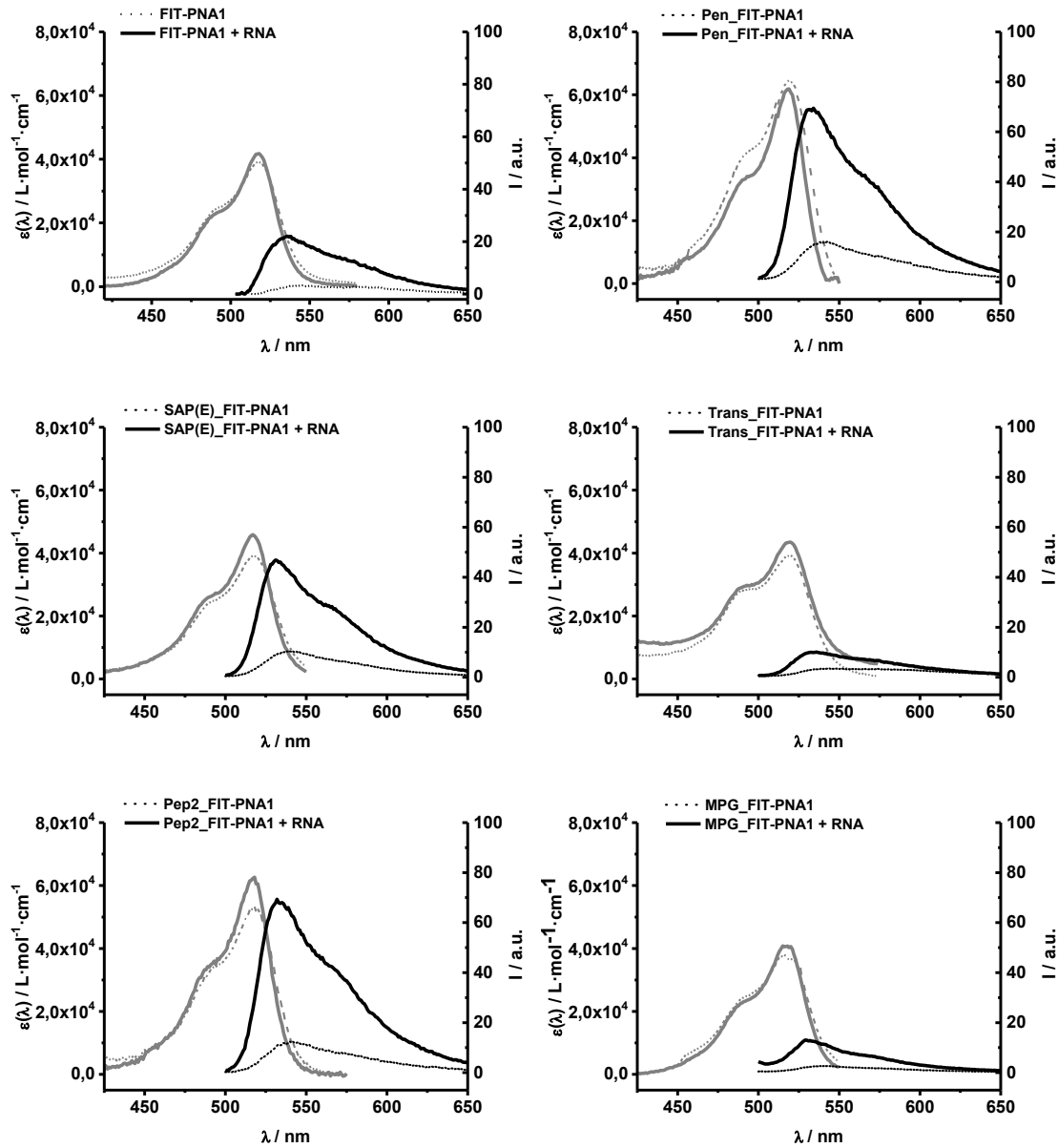
Tabelle 9.1.2.1 Fluoreszenzdaten der FIT-Sonden und FIT-Sonden-Konjugate/Aggregate.

| Sonde              | $I_0$ | $I$ | $I/I_0$ | $\epsilon$<br>(485nm) | $\Phi_0$ | $\Phi$ | $\Phi/\Phi_0$ | Br<br>(485nm) |
|--------------------|-------|-----|---------|-----------------------|----------|--------|---------------|---------------|
| FIT-DNA1           | 4.9   | 142 | 29      | 45108                 | 0.01     | 0.32   | 32            | 14            |
| Pen_FIT-DNA1       | 4.7   | 140 | 30      | 41658                 | 0.01     | 0.25   | 25            | 11            |
| SAP(E)_FIT-DNA1    | 3.8   | 110 | 29      | 34725                 | 0.01     | 0.33   | 33            | 11            |
| R8 + FIT-DNA1      | 5.7   | 161 | 28      | 46267                 | 0.01     | 0.33   | 33            | 15            |
| Palm_FIT-DNA1      | 9.7   | 115 | 12      | 29999                 | 0.02     | 0.23   | 12            | 6.8           |
| PG-Amin + FIT-DNA1 | 5,6   | 162 | 29      | 85625                 | 0.01     | 0.33   | 33            | 16            |
| FIT-PNA1           | 2.7   | 22  | 8       | 20280                 | 0.01     | 0.09   | 9             | 1.8           |
| Pen_FIT-PNA1       | 15    | 68  | 4.5     | 35686                 | 0.05     | 0.24   | 5             | 8.5           |
| SAP(E)-FIT-PNA1    | 9.9   | 45  | 4.5     | 21356                 | 0.03     | 0.16   | 5             | 3.4           |
| Trans_FIT-PNA1     | 3.2   | 11  | 3.5     | 26008                 | 0.01     | 0.03   | 3             | 0.8           |
| Pep2_FIT-PNA1      | 11    | 68  | 6       | 30757                 | 0.05     | 0.29   | 6             | 8.9           |
| MPG_FIT-PNA1       | 2.5   | 12  | 5       | 21360                 | 0.01     | 0.02   | 0.2           | 0.5           |

Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5  $\mu$ M RNA-Zielsequenz in PBS bei 37 °C. TO:  $\lambda_{ex}$  = 485 nm und  $\lambda_{em}$  = 535 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

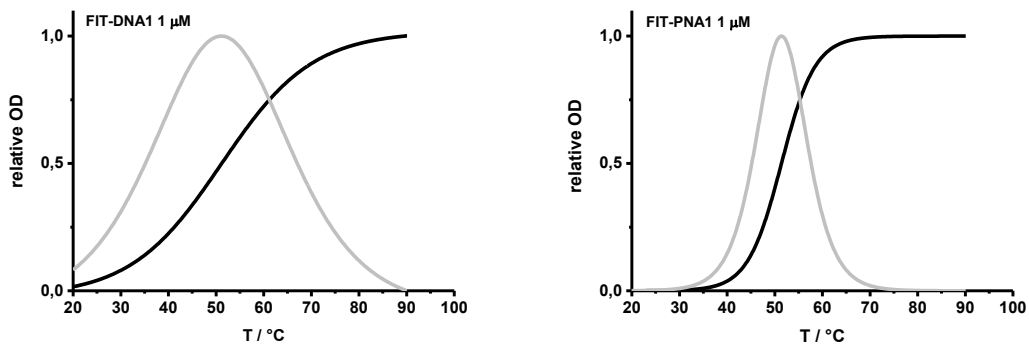
# Absorptions- und Emissionsspektren der FIT-Sonden und FIT-Sonden-Konjugate/Aggregate

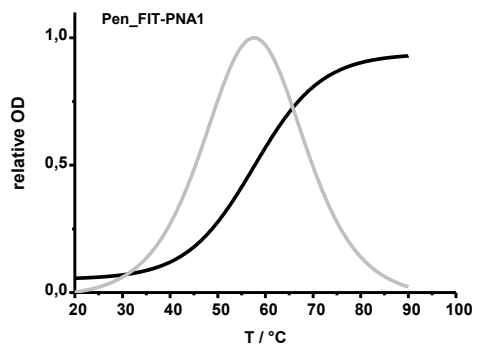
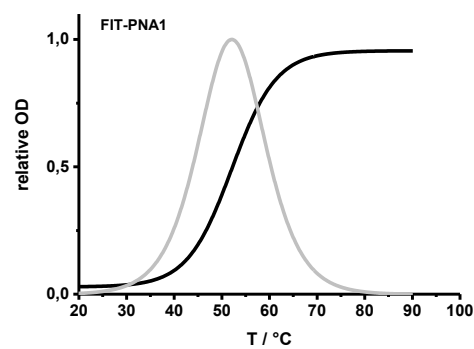
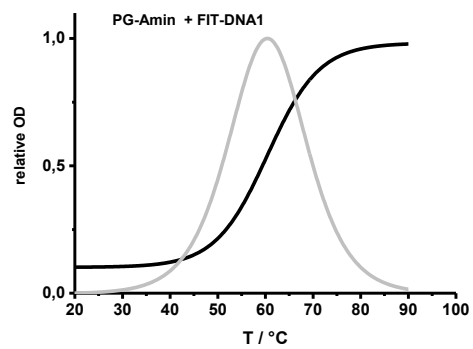
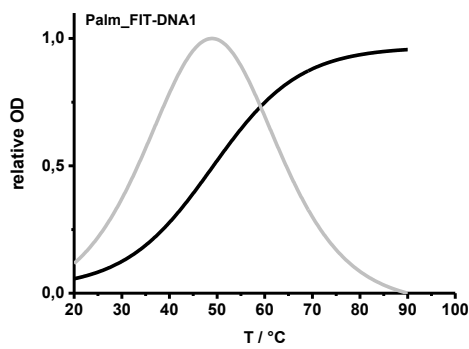
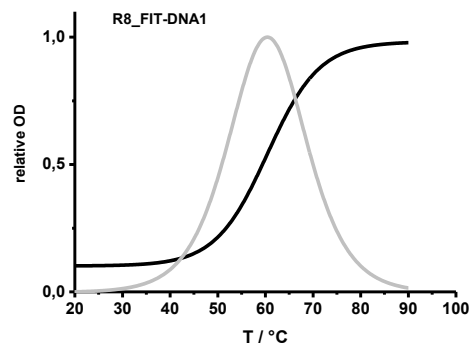
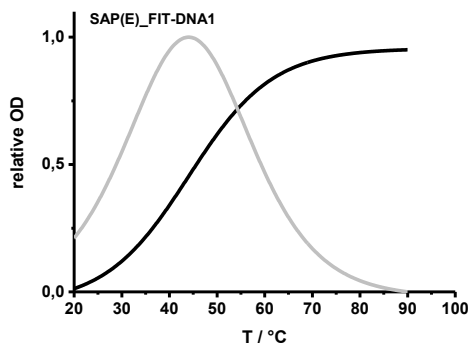
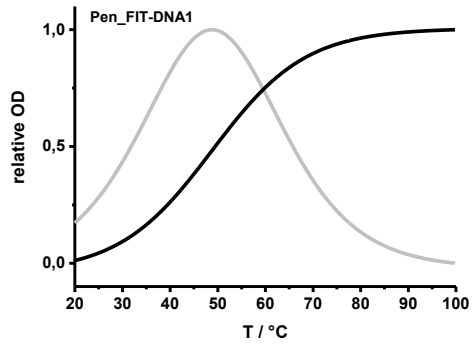
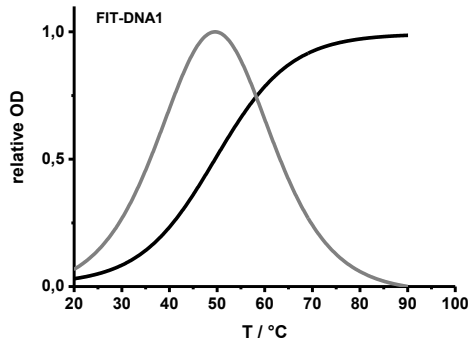


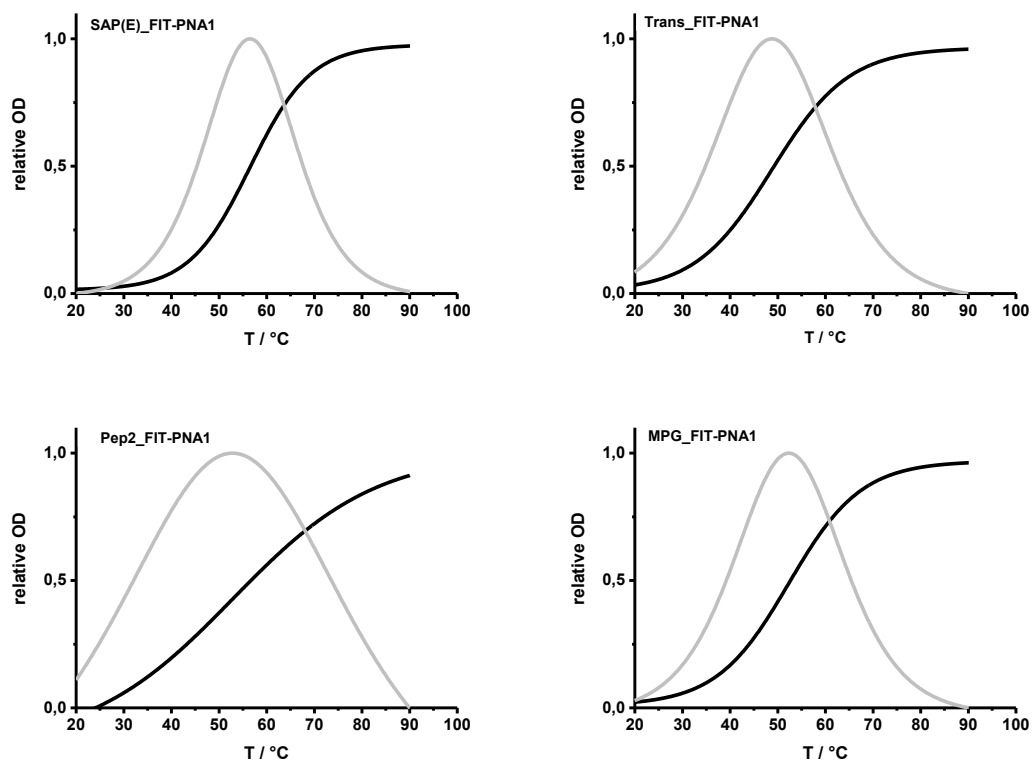


**Abbildung 9.1.2.1** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der FIT-Sonden und FIT-Sonden-Konjugate/Aggregate in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5 Äq. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37 °C in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 650 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

### Schmelzkurven der FIT-Sonden und FIT-Sonden-Konjugate/Aggregate

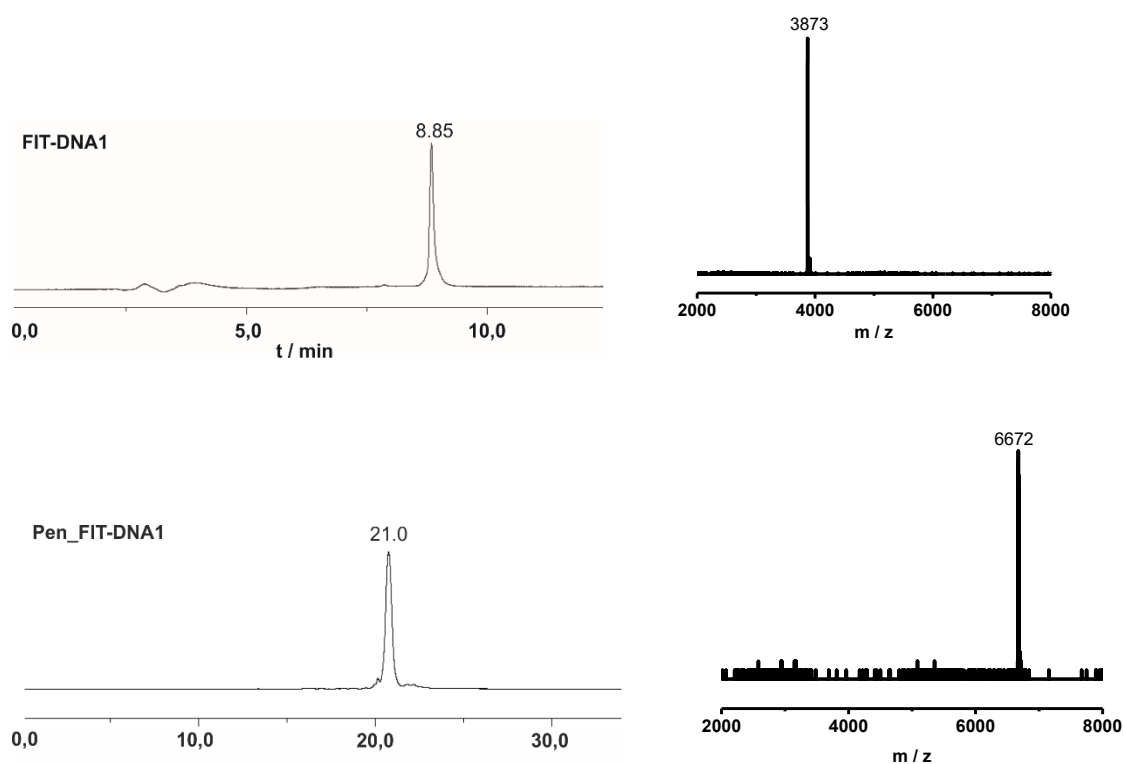






**Abbildung 9.1.2.2** Schmelzkurven (schwarz) und die Ableitungen (grau). Bedingungen: 1 oder 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 1 Äq. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); 20 - 90 °C.  $\lambda_{\text{em}} = 260 \text{ nm}$ .

### Chromatogramme und Massenspektren der hergestellten FIT-Sonden und FIT-Sonden-Peptid-Konjugate (DNA-basiert)



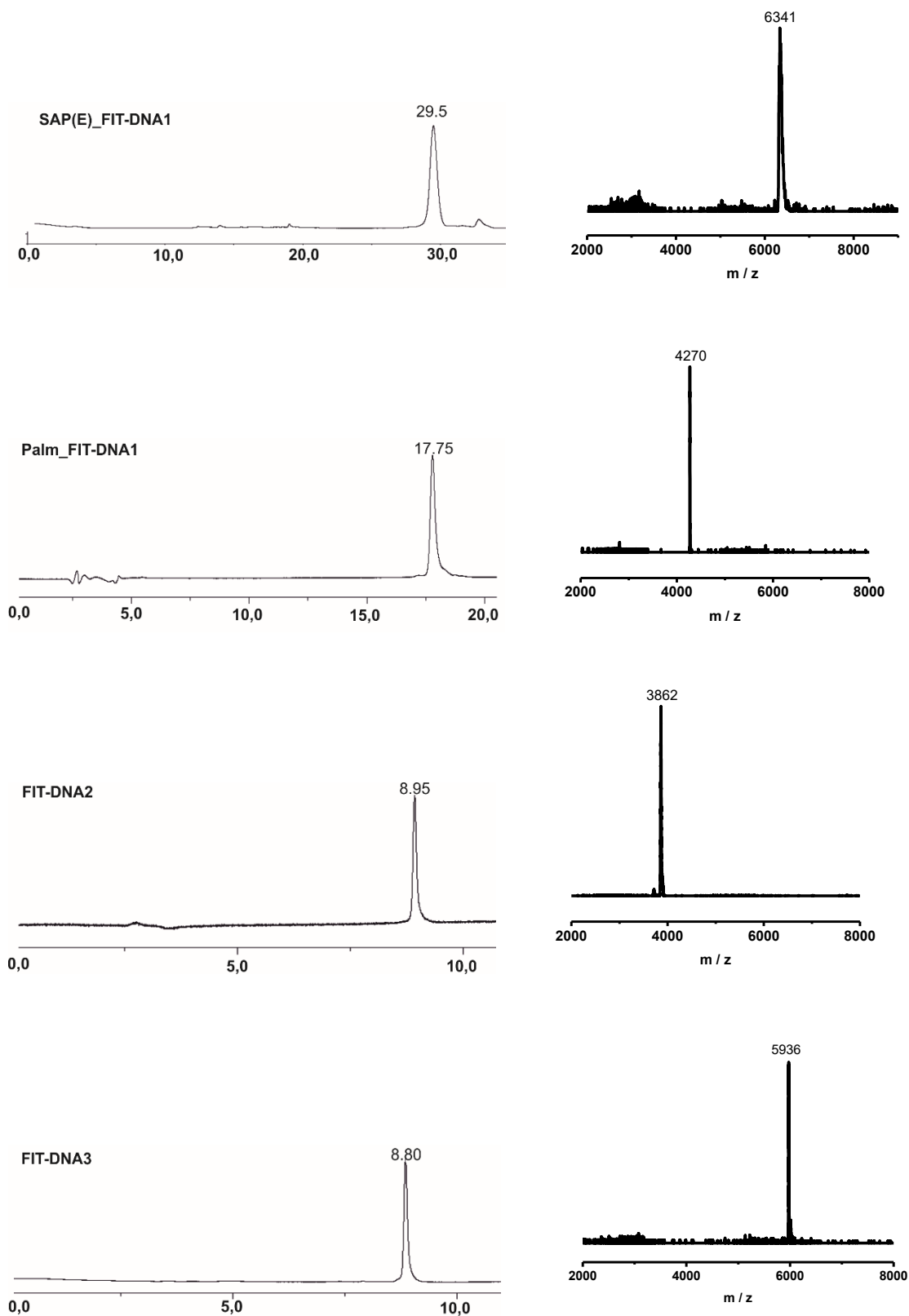
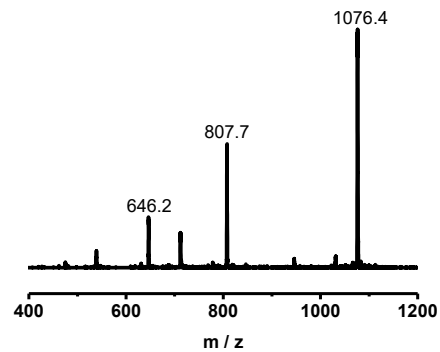
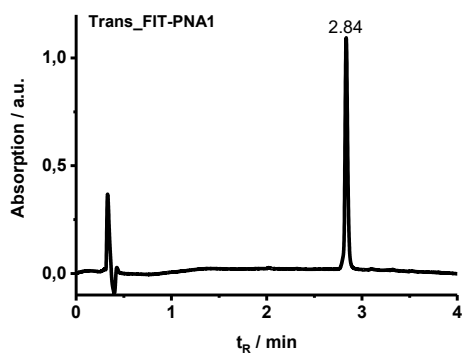
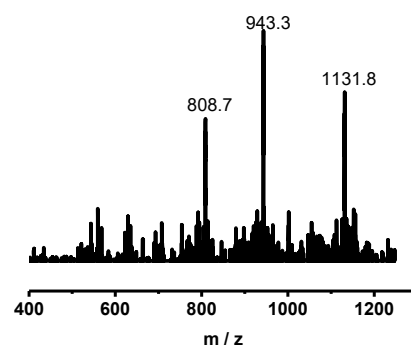
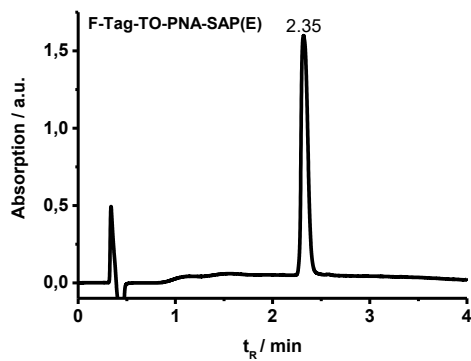
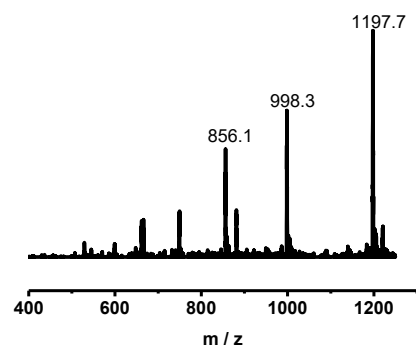
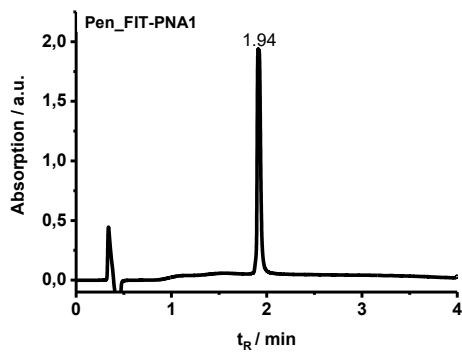
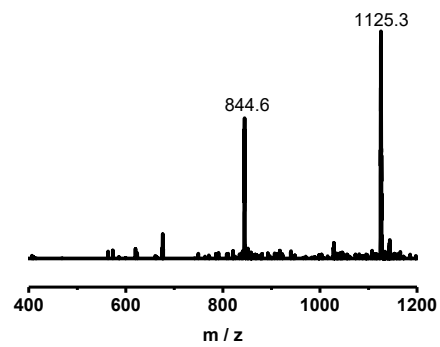
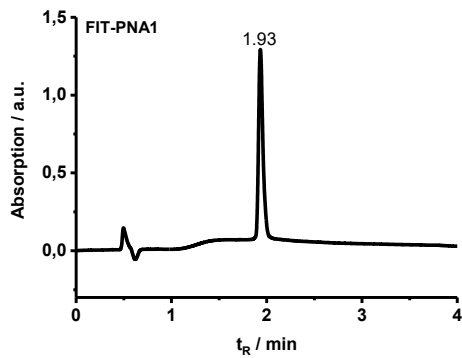


Abbildung 9.1.2.3 RP-HPLC-UV (links) und MALDI-TOF (rechts).

**Chromatogramme und Massenspektren der hergestellten FIT-Sonden und FIT-Sonden-Peptid-Konjugate (PNA-basiert)**



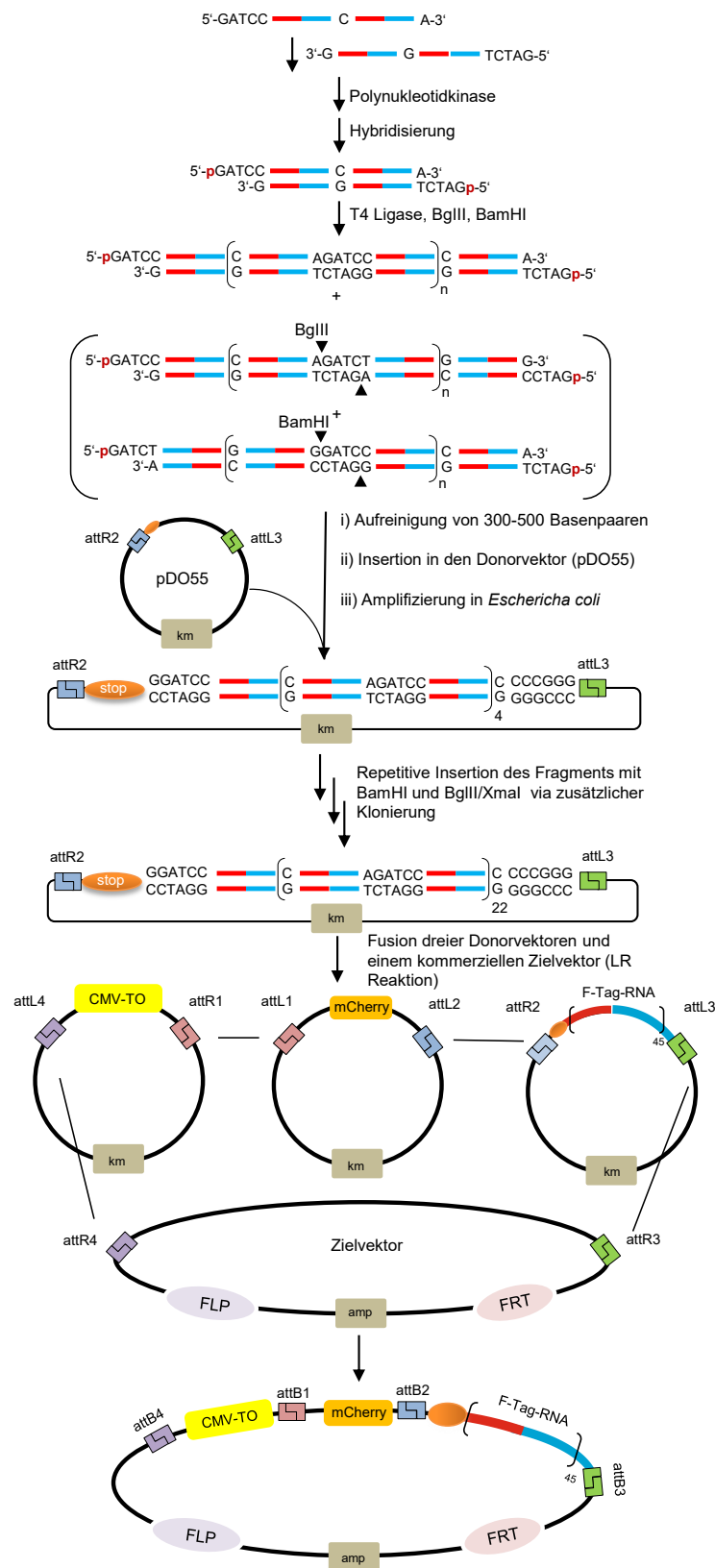


## Vektorkarte der *Flp-In*<sup>TM</sup> 293 T-Rex<sup>TM</sup> Zellen



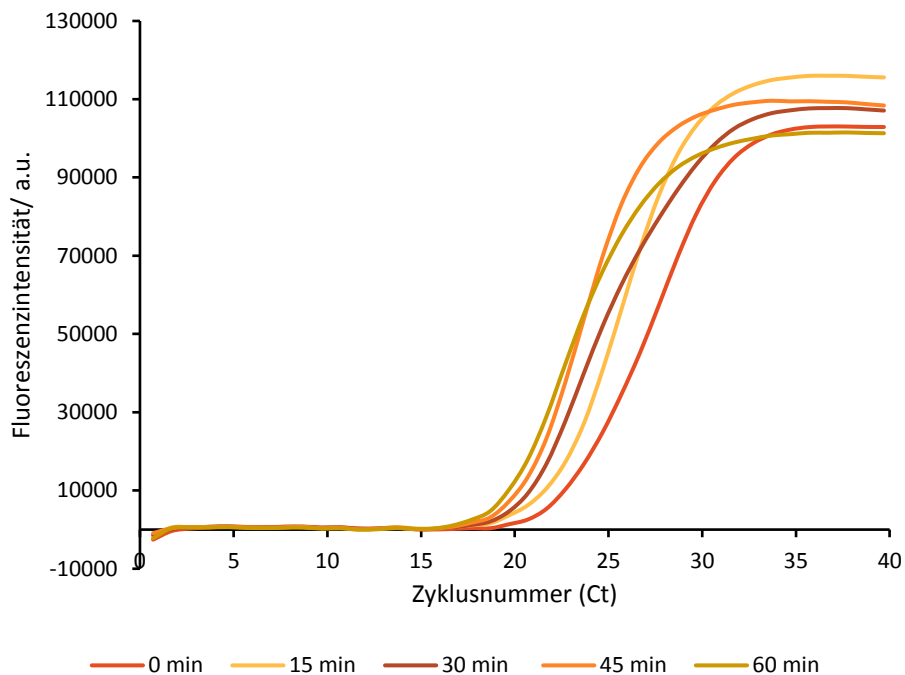


## Schematische Darstellung der Vektor-Klonierung



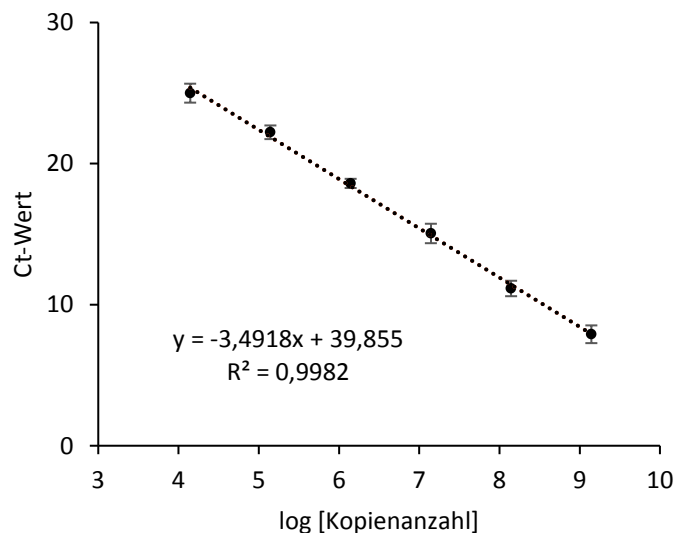
**Abbildung 9.1.3.2** Schematische Darstellung der Vektor-Klonierung. BglIII, BamHI = Schnittstellen für die Restriktionsenzyme; attR1, attR2, attL1, attL2, attL3, attL4, attB1, attB2, attB3, attB4 = Rekombinationsseiten; km = Kanamycin Restriktionsgen; amp = Ampicillin Restriktionsgen; CMV-TO = Expressionsvektor; mCherry = Fluoreszenzprotein; FLP = Rekombinase Flippase; FRT = Flippase Erkennungssequenz.

### Amplifizierungskurven für die quantitative PCR



**Abbildung 9.1.3.3** PCR-Kurven zur quantitativen Analyse des mRNA-Levels. Jede Kurve repräsentiert den Mittelwert dreier Messungen. Die Messungen erfolgten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten der *Flp-In™ 293 T-REx™* Zellen mit 2 µg/ml Doxycyclin durch SYBRGold™.

### Kalibrierungskurve zur quantitativen Analyse des mRNA-Levels



**Abbildung 9.1.3.4** Logarithmische Auftragung der PCR-Kurven der 139-bp Referenzsequenz (Sequenz zwischen dem mCherry und der F-Tag-Region in einer 10-fachen Verdünnungsserie (0.1 – 10<sup>-6</sup> ng/µL). Die Gerade beschreibt das Verhältnis zwischen dem Ct-Wert und der Kopienanzahlen.

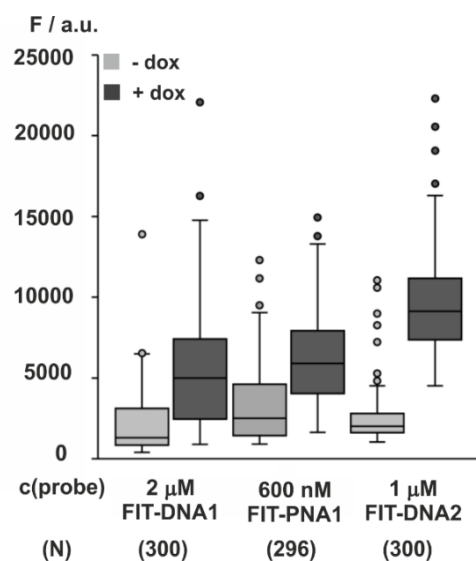
### Quantitative Analyse des mRNA Levels

**Tabelle 9.1.3.1** Ct-Werte und die berechnete Menge an Referenzsequenz pro *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit 2 µg/ml Doxycyclin.

| Batch-Nr. | Inkubationszeit (min) | Ct         | Kopien / ng    | Standard / Well (ng) | Kopien / Well | Zellen / Well | Kopien / Zelle |
|-----------|-----------------------|------------|----------------|----------------------|---------------|---------------|----------------|
| 1         | 0                     | 20.4 ± 0.4 | 38628 ± 8978   | 1140                 | 4,404E+07     | 200000        | 220            |
|           | 15                    | 20.8 ± 0.5 | 28383 ± 8528   | 2130                 | 6,046E+07     | 200000        | 302            |
|           | 30                    | 19.8 ± 0.4 | 57187 ± 13013  | 1260                 | 7,206E+07     | 200000        | 360            |
|           | 45                    | 20.2 ± 0.3 | 41855 ± 8162   | 1500                 | 6,278E+07     | 200000        | 314            |
|           | 60                    | 19.1 ± 0.4 | 85788 ± 19210  | 1860                 | 1,596E+08     | 200000        | 798            |
| 2         | 0                     | 24.0 ± 0.3 | 3382 ± 568     | 1170                 | 3,957E+06     | 120000        | 33             |
|           | 15                    | 20.9 ± 0.5 | 66459 ± 19620  | 240                  | 1,595E+07     | 120000        | 133            |
|           | 30                    | 18.9 ± 0.5 | 254022 ± 73965 | 240                  | 6,097E+07     | 120000        | 508            |
|           | 45                    | 18.3 ± 0.2 | 163689 ± 20199 | 540                  | 8,839E+07     | 120000        | 737            |
|           | 60                    | 20.0 ± 0.2 | 49628 ± 5222   | 870                  | 4,318E+07     | 120000        | 360            |
| 3         | 0                     | 23.1 ± 0.7 | 6398 ± 2262    | 600                  | 3,839E+06     | 75000         | 51             |
|           | 15                    | 22.8 ± 0.2 | 14059 ± 2026   | 330                  | 4,639E+06     | 75000         | 62             |
|           | 30                    | 24.0 ± 1.0 | 3275 ± 1553    | 630                  | 2,063E+06     | 75000         | 28             |
|           | 45                    | 19.9 ± 0.4 | 50508 ± 12230  | 1020                 | 5,152E+07     | 75000         | 687            |
|           | 60                    | 17.7 ± 0.1 | 166606 ± 12063 | 810                  | 1,350E+08     | 75000         | 1799           |

#### 9.1.4 Anhang zu Kapitel 4.1.7

#### Box-Diagramm der Fluoreszenzwerte nach der Transfektion mit SLO



**Abbildung 9.1.4.1** Box-Diagramm der Fluoreszenzintensität von *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen nach Transfektion mit SLO und der jeweils angegebenen FIT-Sonde. Die Zellen wurden anschließend durch die ROI-Analyse ausgewertet. -Dox: ohne vorherige Stimulation mit 2 µg/ml Doxycyclin; +Dox: 1 h Stimulation mit 2 µg/ml Doxycyclin.

## 9.2 Anhang zu Kapitel 4.2

### 9.2.1 Anhang zu Kapitel 4.2.1

#### Sequenzierungsdaten der T-Zellen

##### CCRF-CEM

>426662801\_CC\_1\_CC\_fw.ab1

NTNNNNNNNTNNNTCCNGGAGCTTGGTGACTCTGCTGTGTATTTCTGTGCCAGCAGCCTTGGGACAGATAC  
GCAGTATTTTGGCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCACCCGAGGTCGCT  
GTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACANN

>426662801\_CC\_3\_CC\_fw.ab1

TNNNTNNTNNNTCCCTGGAGCTTGGTGACTCTGCTGTGTATTTCTGTGCCAGCAGCCTTGGGACAGATACGCA  
GTATTTTGGCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTG  
TTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACN

>426662801\_CC\_2\_reverse.ab1

NNNNNNNNNCTCNGTGGGACACGTTTTTCAGGTCCTCGAGCACTGTCAGCCGGGTGCCTGGGCCAAAATA  
CTGCGTATCTGTCCCAAGGCTGCTGGCACAGAAATACACAGCAGAGTCACCAAGCTCCAGGGAATTGATGTGA  
AGATTTAAGTGAGCTTTGTCTGGAGATTAGGTGANA

>426662801\_CC\_4\_reverse.ab1

NNNNNNNNNNCNGGTGGGANNCGTTTTTCAGGTCCTCGAGCACTGTCAGCCGGGTGCCTGGGCCAAAATAC  
TGCATATCTGTCCCAAGGCTGCTGGCACAGAAATACACAGCAGAGTCACCAAGCTCCAGGGAATTGATGTGAA  
GATTTAAGTGAGCTTTGTCTGGAGATTAGGTGAGAA

##### **Consensus**

>CC\_forward

GGAGCTTGGTGACTCTGCTGTGTATTTCTGTGCCAGCAGCCTTGGGACAGATACGCAGTATTTTGGCCAGGC  
ACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAG  
CAGAGATCTCCACAC

>CC\_reverse

CTCGGGTGGGACACGTTTTTCAGGTCCTCGAGCACTGTCAGCCGGGTGCCTGGGCCAAAATACTGCGTATCTG  
TCCCAAGGCTGCTGGCACAGAAATACACAGCAGAGTCACCAAGCTCCAGGGAATTGATGTGAAGATTTAAGTG  
AGCTTTGTCTGGAGATTAGGTGAGAA

| Score               | Expect       | Identities | Gaps       | Strand |
|---------------------|--------------|------------|------------|--------|
| 213 bits(115) 1e-60 | 119/121(98%) | 1/121(0%)  | Plus/Minus |        |

Query ----- 0

Sbjct 180 tctcacctaatactccagacaagctcacttaaatcttcacatcaattccct 129

## 9.2 Anhang zu Kapitel 4.2

```
Query 1 GGAGCTTGGTGACTCTGCTGTGTATTCTGTGCCAGCAGCCTTGGGACAGATACGCAGTA 60
|||||
Sbjct 128 GGAGCTTGGTGACTCTGCTGTGTATTCTGTGCCAGCAGCCTTGGGACAGATACGCAGTA 69

Query 61 TTTTGGCCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTCCCACCCGA 120
|||||
Sbjct 68 TTTTGGCCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTCCCACCCGA 10

Query 121 Ggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctccacac 162
|
Sbjct 9 G-----
```

Forward primer binding site      Reverse Primer binding site

Abbildung 9.2.1.1 Sequenzierungsdaten der CCRF-CEM-Zellen.

### Jurkat

```
>426662801_Ju_1_Jurkat_fw.ab1
NNNNNNNNNNNTCTGTGNNGCAGTTTCTCGACCTGTTCCGGCTAACTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACC
AGGTTAACCGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAG
AGATCTCCACAC

>426662801_Ju_3_Jurkat_fw.ab1
NNNNNNNNNNCNCNCTGTGNNGCAGTTTCTCGACCTGTTCCGGCTAACTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACC
AGGTTAACCGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAG
AGATCTCCACACCA

>426662801_Ju_2_reverse.ab1
CNNNNNNNNNNTCNGGTGGGACNCCTTGTTTCAGGTCCTCTACAACGGTTAACCTGGTCCCCGAACCGAAGGTG
TAGCCATAGTTAGCCGAACAGGTCGAGAACTGCTGGCACAGAAGTACACAGCTGAGTCCCTGGGTTCTGAG
GGCTGGATCTTCAA

>426662801_Ju_4_reverse.ab1
NNNNNNNNNNNCTCGNGTGCGGACNCCTTGTTTCAGGTCCTCTACAACGGTTAACCTGGTCCCCGAACCGAAG
GTGTAGCCATAGTTAGCCGAACAGGTCGAGAACTGCTGGCACAGAAGTACACAGCTGAGTCCCTGGGTTCT
GAGGGCTGGATCTTNN
```

### Consensus

>Ju\_forward

```
CTGTGNNGCAGTTTCTCGACCTGTTCCGGCTAACTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCAGGTTAACCGTTGTAGAGGAC
CTGAACAAGGTGTTCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACAC
```

>Ju\_reverse

```
GTGGGACNCCTTGTTTCAGGTCCTCTACAACGGTTAACCTGGTCCCCGAACCGAAAGGTGTAGCCATAGTTAGCCGAACAGG
TCGAGAACTGCTGGCACAGAAGTACACAGCTGAGTCCCTGGGTTCTGAGGGCTGGATCTT
```

| Score        | Expect | Identities | Gaps     | Strand     |
|--------------|--------|------------|----------|------------|
| 161 bits(87) | 4e-45  | 91/93(98%) | 1/93(1%) | Plus/Minus |

## 9.2 Anhang zu Kapitel 4.2

```
Query 0 -----CTGTGNN- 7
      |||||
      tgaagatccagccctcagaacccagggactcagctgtgtacttCTGTGCCA 93

Query 8 GCAGTTTCTCGACCTGTTCTGGCTAACTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCAGGTTAA 67
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 92 GCAGTTTCTCGACCTGTTCTGGCTAACTATGGCTACACCTTCGGTTCGGGGACCAGGTTAA 33

Query 68 CCGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGNGTCCCACccgaggtcgctgtgtttgagccatc 125
      ||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct 32 CCGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGNGTCCCAC-----

Query 126 agaagcagagatctccacac

Sbjct -----
```

Abbildung 9.2.1.2 Sequenzierungsdaten der Jurkat-Zellen.

### MOLT-16

```
>426662801_Mo_1_Mo_fw.ab1
NNNNNNNNNNNNNNNNCNCCTGAGACAGCAGCTTCTACATCTGCAGTGCAGGGGAGTCGGGGGGCGTAAC
AGATACGCAGTATTTTGGCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCACCCGAG
GTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACNN

>426662801_Mo_3_Mo_fw.ab1
NNNNNNNNNNNNNNNNCNCNNNNACAGCAGCTTCTACATCTGCAGTGCAGGGGAGTCGGGGGGCGTA
ACAGATACGCAGTATTTTGGCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCACCCG
AGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCNNNGGTCNNTGGGNANNNNNNNNGAA
TGGCNTTAGTNATGGNGATTGGNNAATTTTCATGGATCCTCCNATCCTTTGACCGCCCTTGGGGCCCCCAGTA
TTCGGGCGGGATGGCCGGCTCAAGCTCCTTTACCCCTTCNNNNCCCCGGGNCNGNGTTGGGGGATCGGCCTT
CACCGGCNGGCCCNAAATACAGTGGCGGCCCCNC

>426662801_Mo_2_reverse.ab1
NNNNNNNNNNNCTCGGGTGGNNCACGTTTTTCAGGTCCTCGAGCACTGTCAGCCGGTGCCTGGGCCAAAATA
ACTGCGTATCTGTTACGCCCCCGACTCCCCTGCACTGCAGATGTAGAAGCTGCTGTCTTCAGGATGGGCACTG
GTCAGTGTGAGAGTGGACAAGGTCAGGCTTGCAATGTTGAANNCTGGNCTCATANGAAAAACGCANTGAA
ATGCATAAAAGTAATGTGATTTGCAAANTTCANTGAATCATCAAATCTTTGAACGCACNTTGCGCCGCCNGTA
TTCTGGCGGGCATGCCGNTCNAGCGTCATTTCAACCATCAGGCCCGGGCTTGTGTTGGGGNAACGAGNC

>426662801_Mo_4_reverse.ab1
NNNNNNNNNCTCGGGTGGGACACGTTTTTNAGGTCCTCGAGNACTGTNCAGCCGGTGCCTGGGCCAAAATA
CNNNNNATCTGTTACGCCCCCGACTCCCCTGCACTGCAGATGTAGAAGCTGCTGTCTTCAGGATGGGCACTG
GTCAGTGTGAGAGTGGACAAGGTCAGGCTTGCAATGTTGAANCATCGATGAAGAACGCAGCGAANTGCNAT
AAGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCNAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCG
GGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCANGCTCCGCGCCTGGCGTTGGGGATCGGCCTTACCGGCC
GGCCCCGAAATACAGTGGCGGGCCCCGCCGTAAACCTCCTCTGCGTAGTAACACACACCTCGCAGCCTGGTAGC
GCGGCGGCGGCCACGCCGAAACCCCGACTTCTGAAAGTTGACCTCGGATCANGTAGGAATACCCGCTGA
ACTTTAAGCAN
```

### Consensus

>Molt-16\_forward

## 9.2 Anhang zu Kapitel 4.2

ACAGCAGCTTCTACATCTGCAGTGCAGGGGAGTCGGGGGGCGTAACAGATACGCAGTATTTTGGCCCAGGCACCCGGCT  
GACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCACCCGAGGTCGCTGTGTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACA  
C

>Molt-16\_reverse

Query 11 CTCGGGTGGNNCACGTTTTTCAGTCTCTCGAGCACTGT-CAGCCGGGTGCCTGGGCCAAA 69

||||| ||||||| ||||||| ||||| ||||||| ||||||| |||||||

Sbjct 9 CTCGGGTGGGACACGTTTTTNAGGTCCTCGAGNACTGTNCAGCCGGGTGCCTGGGCCAAA 68

Query 70 ATACTGCGTATCTGTTACGCCCCCGACTCCCTGCACTGCAGATGTAGAAGCTGCTGTC 129

||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

Sbjct 69 ATACNNNNNATCTGTACGCCCCCGACTCCCTGCACTGCAGATGTAGAAGCTGCTGTC 128

Query 130 TTCAGGATGGGCACTGGTCACTGTGACAGTGGACAAAGTTCAGGCTTGCATGTTGAANN 189

||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

Sbjct 129 TTCAGGATGGGCACTGGTCACTGTGACAGTGGACAAAGTTCAGGCTTGCATGTTGAAN 188

Query 190 CTGGNCTCATANGAAAAACGCANTGAAATGC-ATAAAGTAATGTGATTGCAAANTTCA 248

||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

Sbjct 189 ATCGA-TGA-A-GAA---CGCAGCGAANTGCNAT--AAGTAATGTGAATTGCAAANTTCA 240

Query 249 NTGAATCATCAATCTTTGAACGCACNTTGCGCCGCCNGTATTCTGGCGGCATGCCGG 308

||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

Sbjct 241 GTGAATCATCNAATCTTTGAACGCACATTGCGCCGCCAGCATTCTGGCGGCATGCCCTG 300

Query 309 NTCNAGCGTCATTTCAACCATCAGGC-CCCGGGCTGT-GTTGGGG 352

||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

Sbjct 301 TCCGAGCGTCATTTCAACCTCANGCTCCCGCGCTGGCGTTGGGG 346

| Score         | Expect | Identities   | Gaps      | Strand     |
|---------------|--------|--------------|-----------|------------|
| 206 bits(111) | 5e-58  | 116/119(97%) | 1/119(0%) | Plus/Minus |

Query 155 -----CTCCTGAAGACA 167

||||| |||||||

Sbjct 185 tcaaccatgcaagcctgacctgtccactctgacagtgaccagtgccATCCTGAAGACA 126

Query 168 GCAGCTTCTACATCTGCAGTGCAGGGGAGTCGGGGGGCGTAACAGATACGCAGTATTTTG 227

||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

Sbjct 125 GCAGCTTCTACATCTGCAGTGCAGGGGAGTCGGGGGGCGTAACAGATACGCAGTATTTTG 66

Query 228 GCCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCACCCGAggtcg 287

||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

Sbjct 65 GCCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGNNCCACCCGAG----- 10

Query 288 ctgtgtttgagccatcagaagcagagatctccacac 325

Sbjct -----

Forward primer binding site      Reverse Primer binding site

Abbildung 9.2.1.3 Sequenzierungsdaten der Molt-16-Zellen.

### 9.2.2 Anhang zu Kapitel 4.2.2

#### Fluoreszenzdaten der T-Zellen-FIT-Sonden

**Tabelle 9.2.2.1** Fluoreszenzdaten der DNA-basierten- und Mixmer-FIT-Sonden.

|                 | $I_0$ | $I$  | $I/I_0$ | $\epsilon^a$ (485nm) | $\Phi_0$ | $\Phi$ | $\Phi/\Phi_0$ | Br (485nm) |
|-----------------|-------|------|---------|----------------------|----------|--------|---------------|------------|
| CCRF-CEM-Test-a | 22    | 184  | 8.4     | 35778                | 0.05     | 0.39   | 7.8           | 14         |
| CCRF-CEM-1-L    | 40    | 164  | 4.1     | 34019                | 0.07     | 0.27   | 3.8           | 9.6        |
| CCRF-CEM-Test-b | 14    | 34.4 | 2.5     | 29472                | 0.04     | 0.09   | 2.2           | 2.6        |
| CCRF-CEM-Test-c | 16    | 165  | 10      | 34373                | 0.03     | 0.3    | 10            | 10         |
| CCRF-CEM-2-L    | 40    | 152  | 3.8     | 27372                | 0.12     | 0.46   | 3.5           | 13         |
| Molt-16-Test-a  | 24    | 117  | 4.9     | 24341                | 0.08     | 0.34   | 4.2           | 8.3        |
| Molt-16-1-L     | 126   | 166  | 1.3     | 28392                | 0.27     | 0.42   | 1.5           | 12         |
| Molt-16-Test-b  | 77    | 146  | 1.8     | 28364                | 0.2      | 0.39   | 1.9           | 11         |
| Molt-16-Test-c  | 52    | 80   | 1.5     | 24393                | 0.18     | 0.28   | 1.5           | 6.8        |
| Jurkat-Test-a   | 70    | 252  | 3.6     | 38631                | 0.17     | 0.46   | 2.7           | 17         |
| Jurkat-Test-b   | 18    | 166  | 9.1     | 31228                | 0.04     | 0.41   | 10            | 13         |
| Jurkat-1-L      | 16    | 151  | 9.4     | 35512                | 0.05     | 0.45   | 9.2           | 16         |
| Jurkat-Test-c   | 21    | 119  | 5.7     | 35332                | 0.04     | 0.22   | 5.5           | 7.7        |
| Jurkat-2-L      | 44    | 110  | 2.5     | 37589                | 0.08     | 0.21   | 2.6           | 7.8        |

Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37 °C. TO:  $\lambda_{ex}$  = 485 nm und  $\lambda_{em}$  = 535 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm, a = Doppelstrang.

**Tabelle 9.2.2.2** Fluoreszenzdaten der Mixmer-FIT-Sonden.

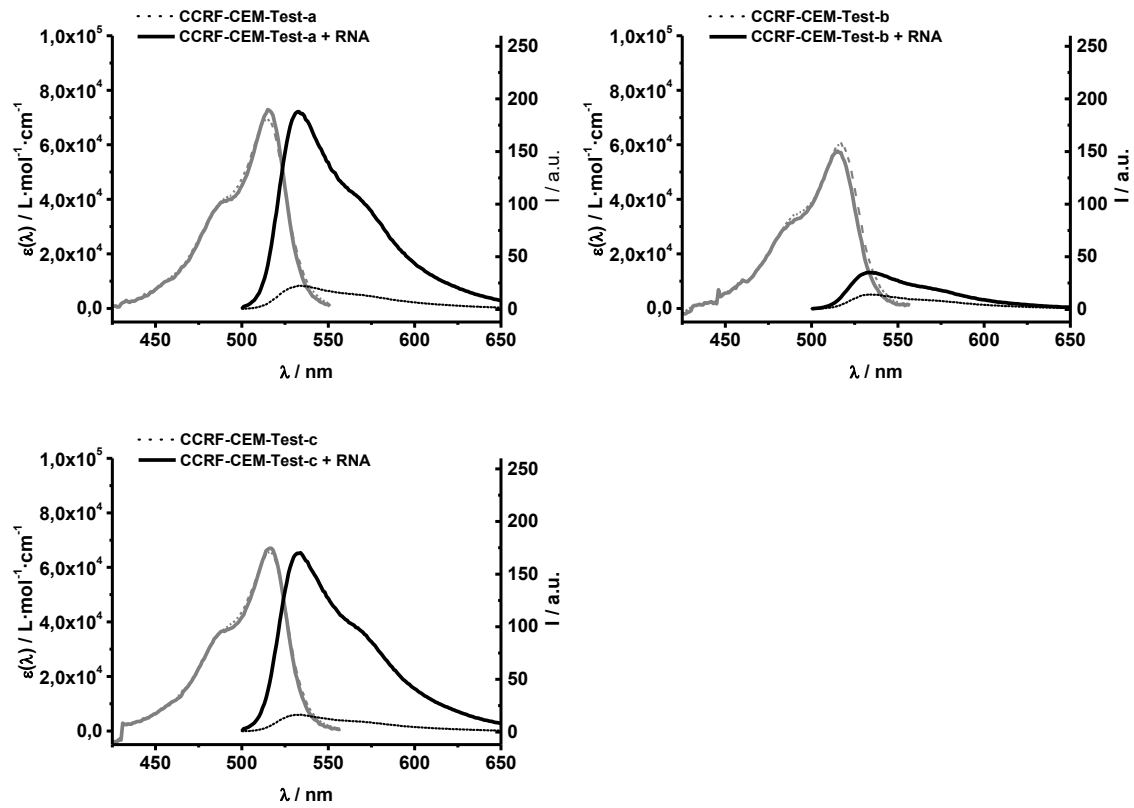
|              | $I_0$ | $I$ | $I/I_0$ | $\epsilon^a$ (485nm) | $\Phi_0$ | $\Phi$ | $\Phi/\Phi_0$ | Br (485nm) |
|--------------|-------|-----|---------|----------------------|----------|--------|---------------|------------|
| Jurkat-1-L   | 16    | 151 | 9.4     | 35512                | 0.05     | 0.45   | 9.2           | 16         |
| Jurkat-2-L   | 44    | 110 | 2.5     | 37589                | 0.08     | 0.21   | 2.6           | 7.8        |
| Jurkat-3-L   | 15    | 185 | 11      | 47718                | 0.03     | 0.23   | 7.6           | 10         |
| Jurkat-4-L   | 52    | 98  | 1.8     | 27502                | 0.14     | 0.28   | 2.0           | 7.7        |
| Jurkat-5-L   | 14    | 34  | 2.4     | 22385                | 0.05     | 0.11   | 2.2           | 2.4        |
| CCRF-CEM-1-L | 40    | 164 | 4.1     | 34019                | 0.07     | 0.27   | 3.8           | 9.6        |
| CCRF-CEM-2-L | 40    | 152 | 3.8     | 27372                | 0.12     | 0.46   | 3.5           | 13         |
| CCRF-CEM-3-L | 12    | 137 | 11      | 31581                | 0.02     | 0.22   | 11            | 6.9        |
| CCRF-CEM-4-L | 18    | 34  | 1.8     | 29324                | 0.03     | 0.07   | 2.3           | 2          |
| CCRF-CEM-5-L | 31    | 112 | 3.6     | 29932                | 0.06     | 0.22   | 3.6           | 6.5        |
| Molt-16-1-L  | 126   | 166 | 1.3     | 28392                | 0.27     | 0.42   | 1.5           | 12         |
| Molt-16-2-L  | 85    | 121 | 1.4     | 50607                | 0.11     | 0.16   | 1.5           | 5.1        |
| Molt-16-3-L  | 5.8   | 154 | 26      | 54663                | 0.01     | 0.32   | 32            | 17         |
| Molt-16-4-L  | 12    | 118 | 9.8     | 33560                | 0.02     | 0.24   | 12            | 8.0        |
| Molt-16-5-L  | 10    | 41  | 4.1     | 25737                | 0.03     | 0.12   | 4.0           | 3.0        |

Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37 °C. TO:  $\lambda_{ex}$  = 485 nm und  $\lambda_{em}$  = 535 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

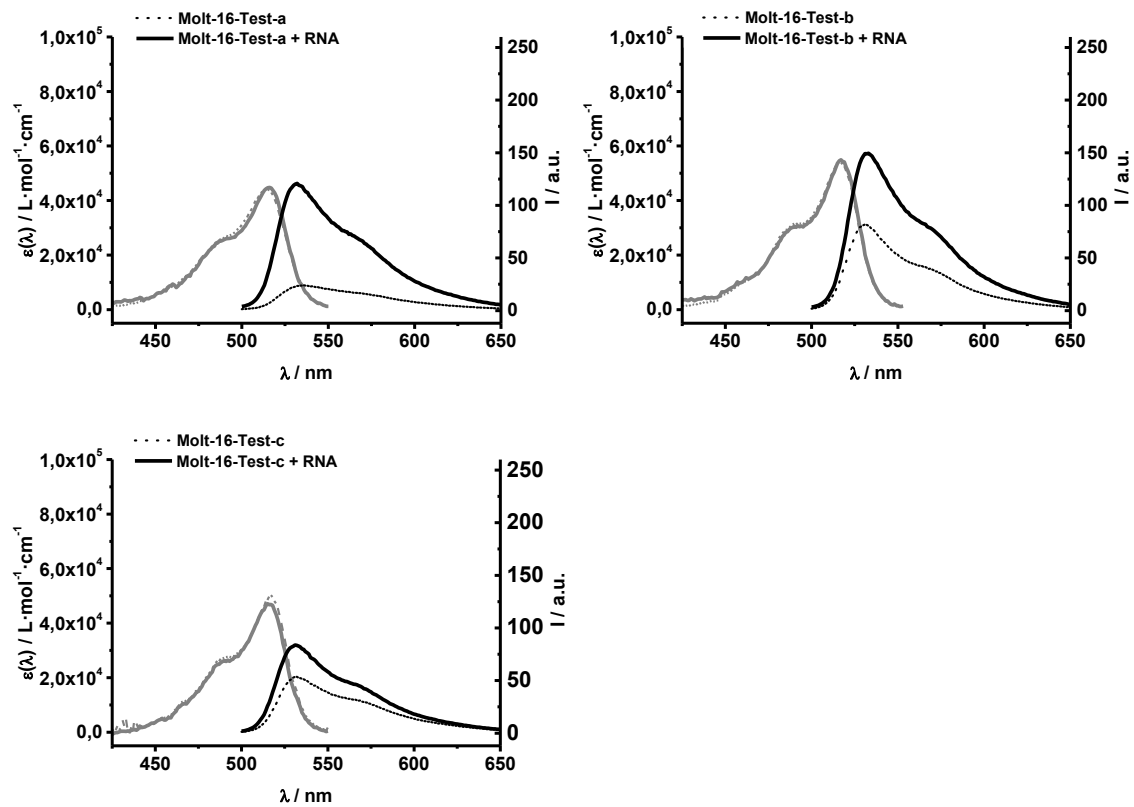


## Absorptions- und Emissionsspektren der DNA-FIT-Sonden

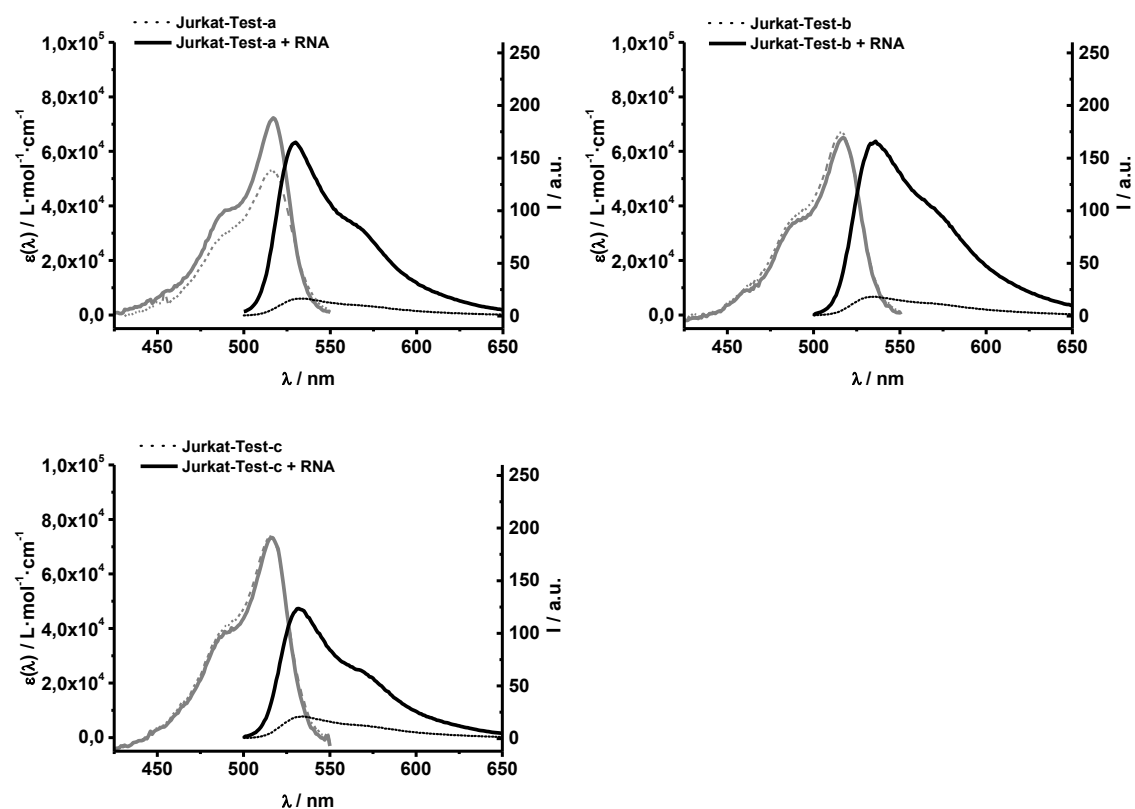
### CCRF-CEM



### Molt-16



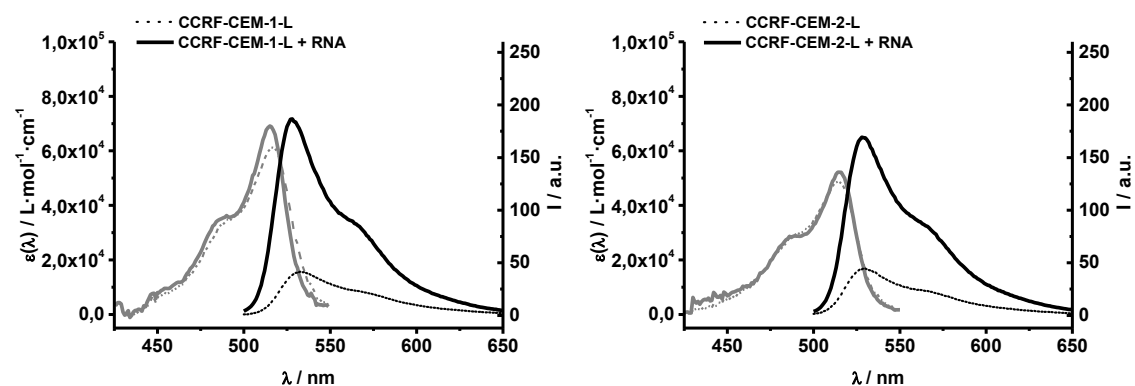
## Jurkat

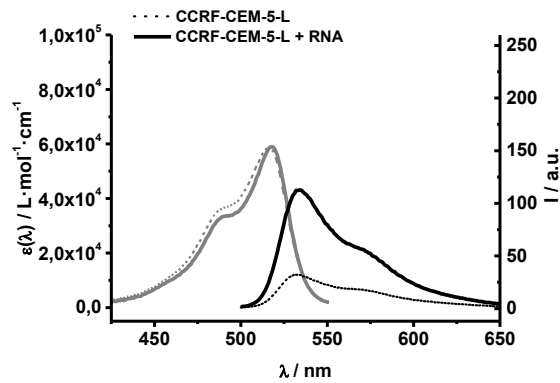
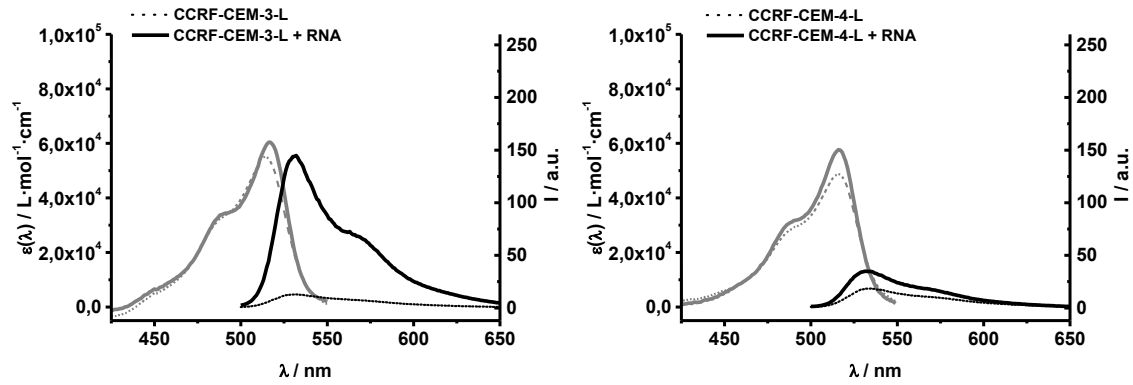


**Abbildung 9.2.2.1** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der DNA-FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37  $^\circ\text{C}$  in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 - 650 \text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$ .

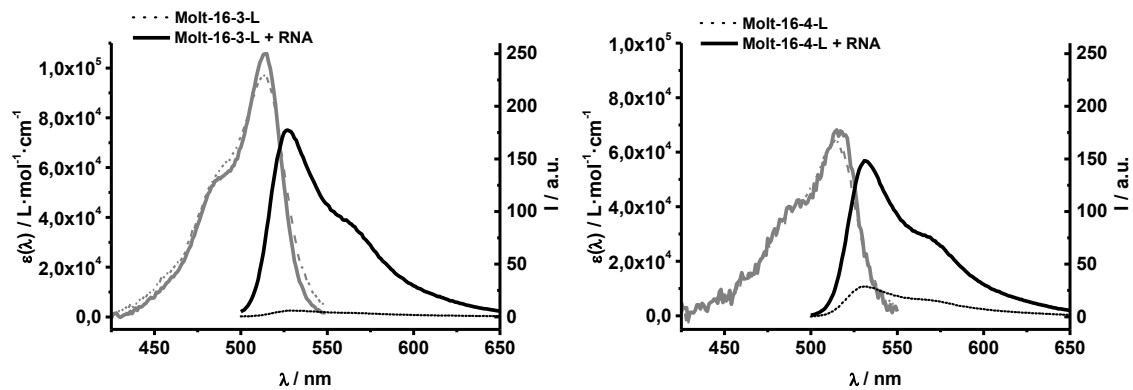
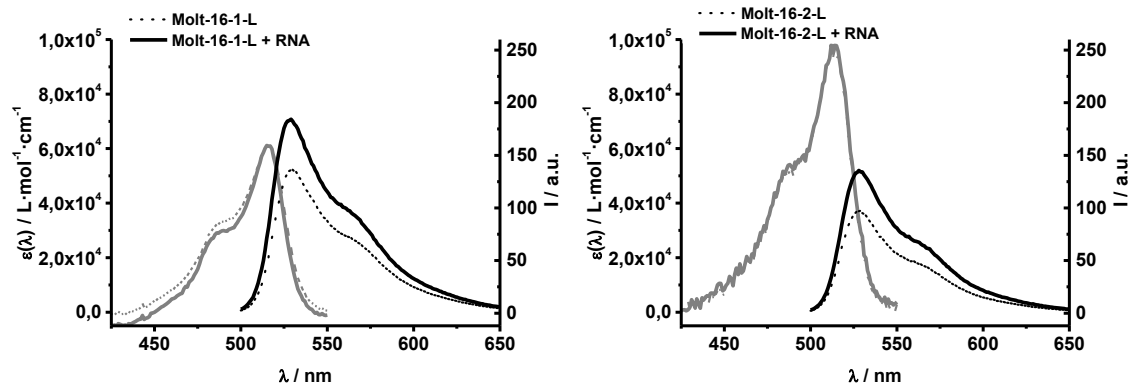
## Absorptions- und Emissionsspektren der Mixmer-FIT-Sonden

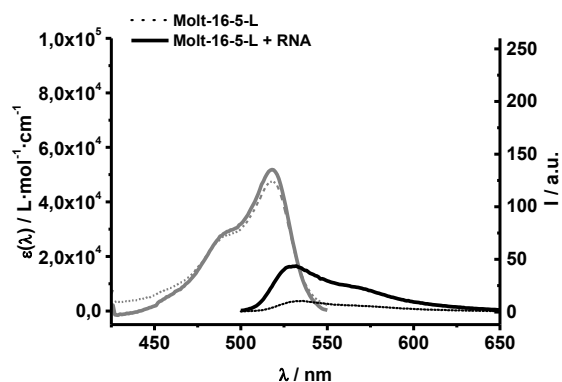
## CCRF-CEM



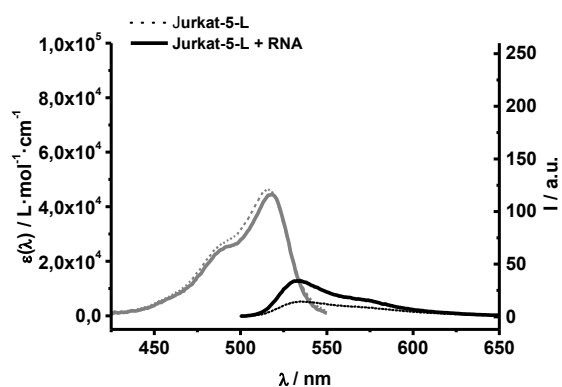
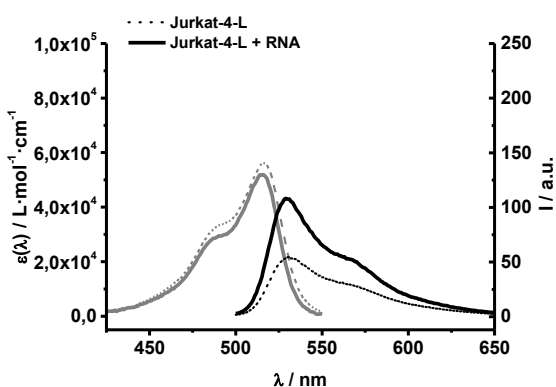
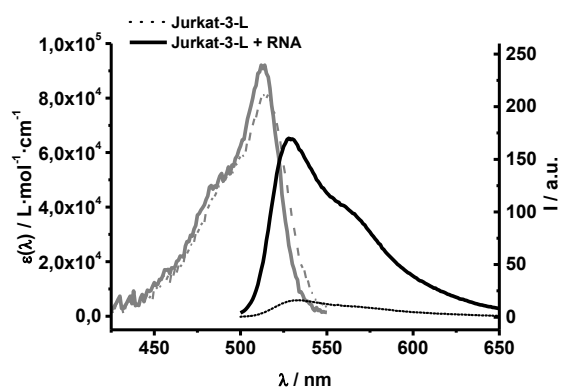
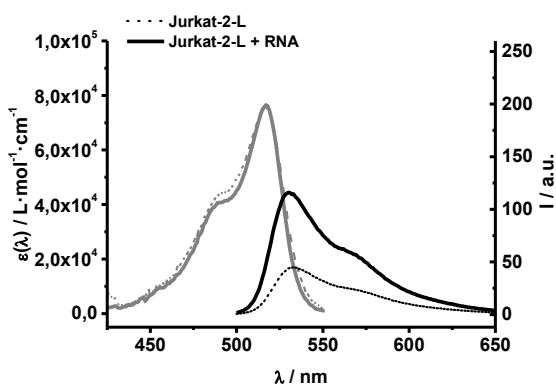
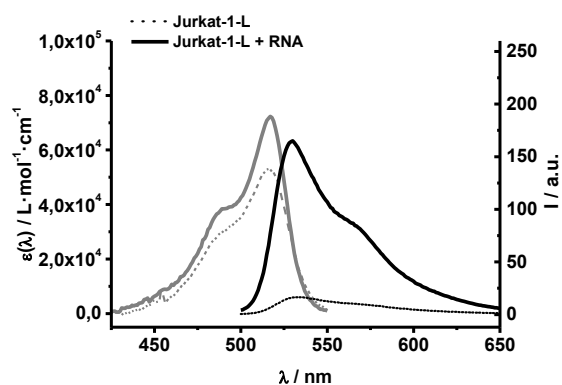


### Molt-16





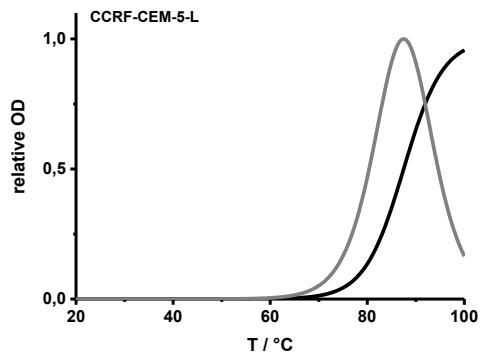
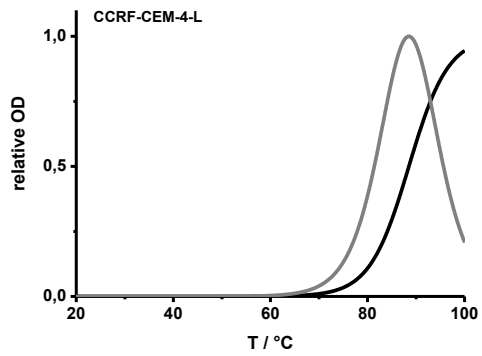
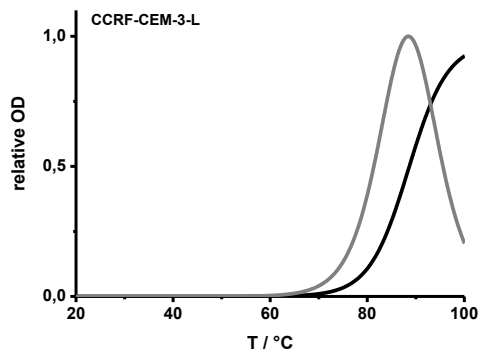
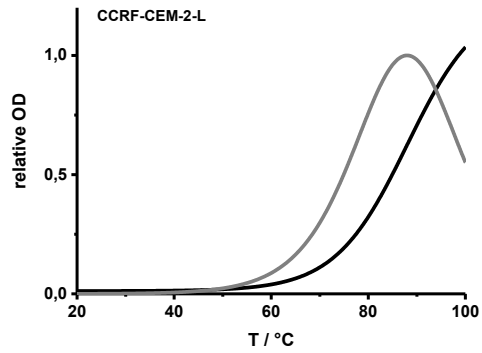
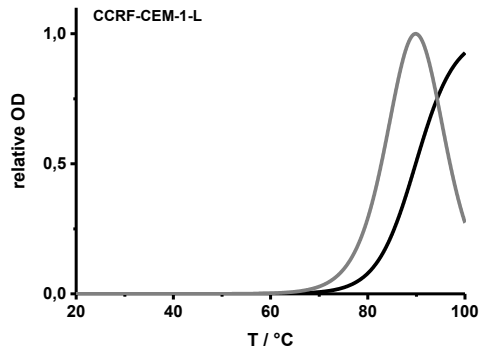
Jurkat



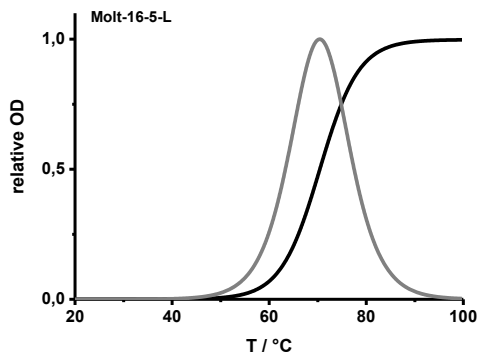
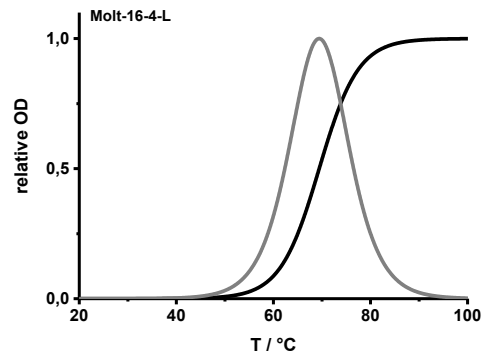
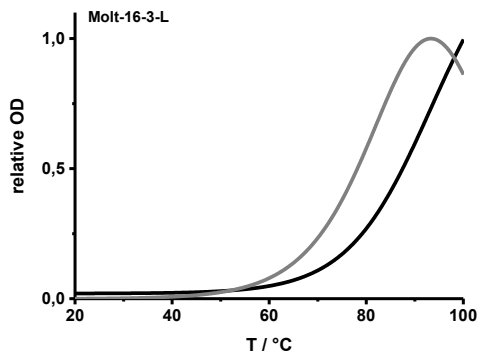
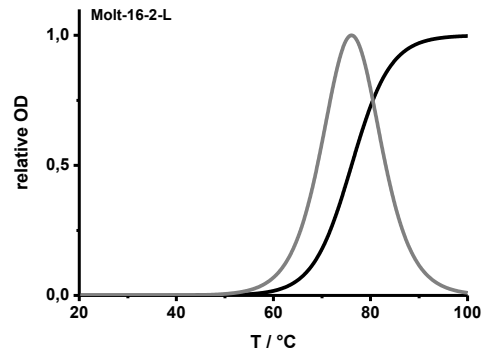
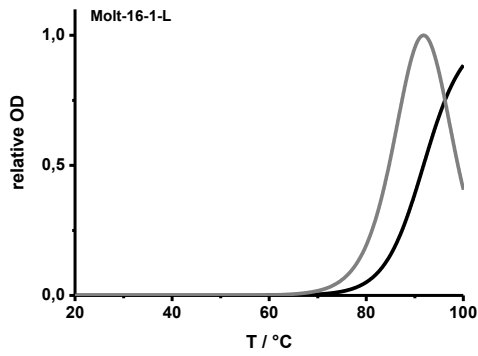
**Abbildung 9.2.2.2** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der Mixmer-FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37  $^\circ\text{C}$  in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 650 nm,  $\text{slit}_{\text{ex}}$  = 5 nm,  $\text{slit}_{\text{em}}$  = 5 nm.

## Schmelzkurven der Mixmer-FIT-Sonden

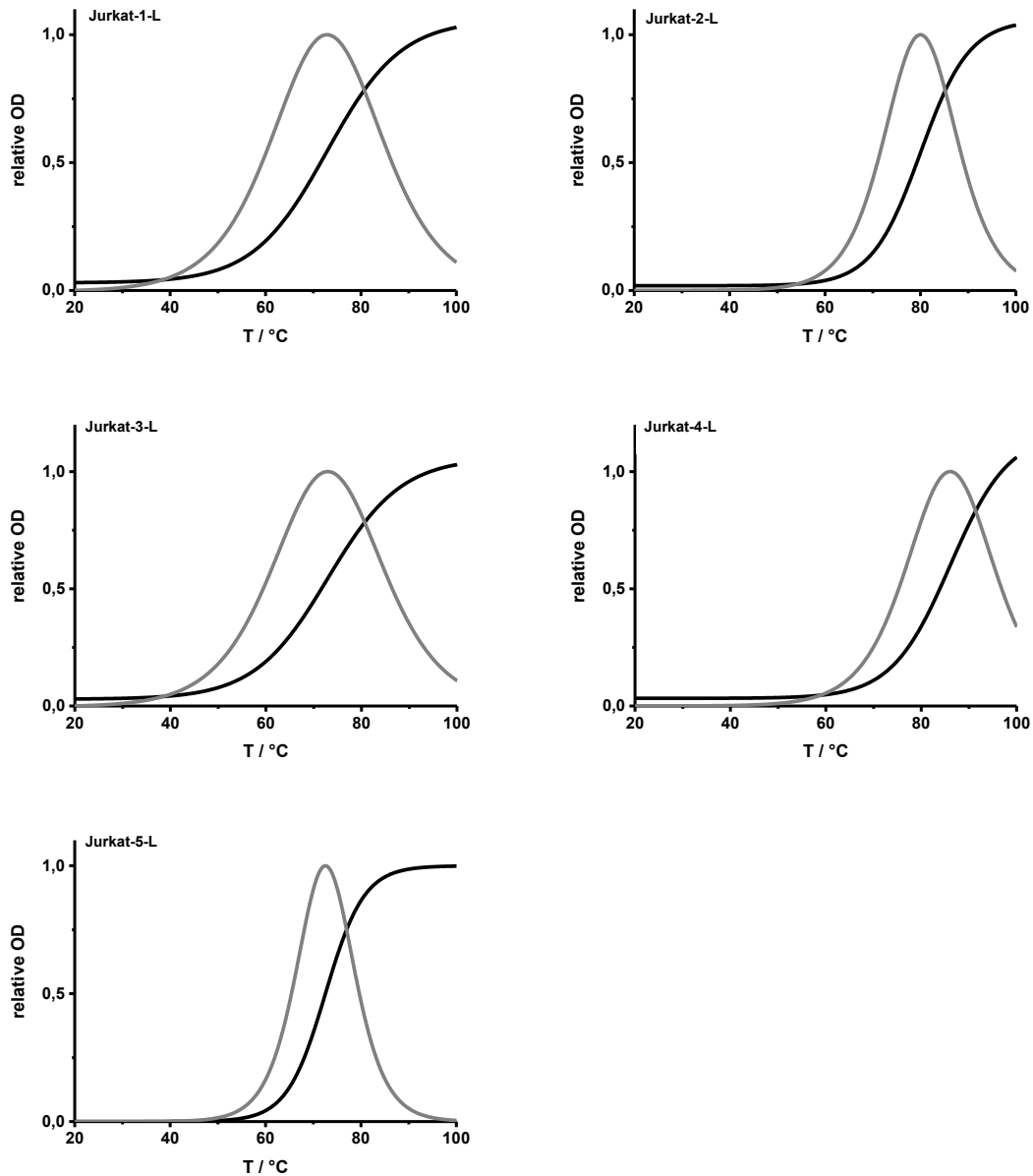
### CCRF-CEM



Molt-1

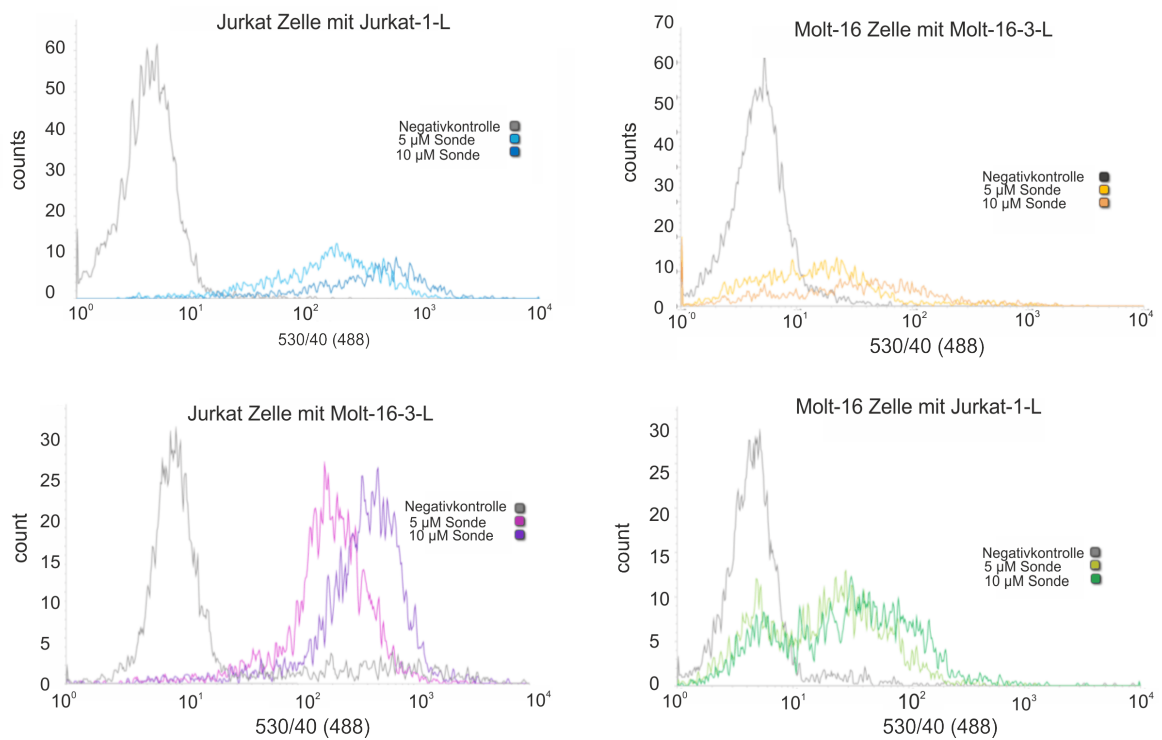


Jurkat



**Abbildung 9.2.2.3** Schmelzkurven (schwarz) und die Ableitungen (grau). Bedingungen: 1 oder 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 1 Äq. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); 20 - 90 °C.  $\lambda_{\text{em}} = 260 \text{ nm}$ .

### Ergebnisse der FACS-Experimente aus der AG Frohme



**Abbildung 9.2.2.4** Erste FACS-Ergebnisse aus der Messung der AG Frohme mit der **Jurkat-1-L** und der **Molt-16-3-L**.



### 9.2.3 Anhang zu Kapitel 4.2.3

#### PCR-Daten zur Quantifizierung des mRNA-Levels

**Tabelle 9.2.3.1** Ct-Werte verschiedener T-Zellen.

| Jurkat           | Ct CDR3        | Ct GAPDH        |
|------------------|----------------|-----------------|
| <b>1.Messung</b> | 19.56          | 19.15           |
|                  | 19.59          | 18.86           |
|                  | 19.66          | 18.64           |
| <b>2.Messung</b> | 19.63          | 19.19           |
|                  | 19.64          | 19.31           |
|                  | 19.58          | 19.22           |
| <b>3.Messung</b> | 21.68          | 20.37           |
|                  | 21.72          | 20.51           |
|                  | 22.1           | 20.39           |
| <b>Molt-16</b>   | <b>Ct CDR3</b> | <b>Ct GAPDH</b> |
| <b>1.Messung</b> | 20.63          | 19.83           |
|                  | 20.47          | 19.95           |
|                  | 20.38          | 19.97           |
| <b>2.Messung</b> | 20.18          | 20.21           |
|                  | 19.97          | 20.24           |
|                  | 19.99          | 19.98           |
| <b>3.Messung</b> | 19.72          | 20.12           |
|                  | 19.92          | 20.46           |
|                  | 19.96          | 20.47           |
| <b>CCRF-CEM</b>  | <b>Ct CDR3</b> | <b>Ct GAPDH</b> |
| <b>1.Messung</b> | 16.97          | 15.17           |
|                  | 16.85          | 15.31           |
|                  | 16.75          | 15.03           |
| <b>2.Messung</b> | 16.90          | 16.28           |
|                  | 16.75          | 15.52           |
|                  | 16.26          | 17.29           |
| <b>3.Messung</b> | 17.2           | 15.95           |
|                  | 17.12          | 16.03           |
|                  | 17.06          | 16.ß1           |

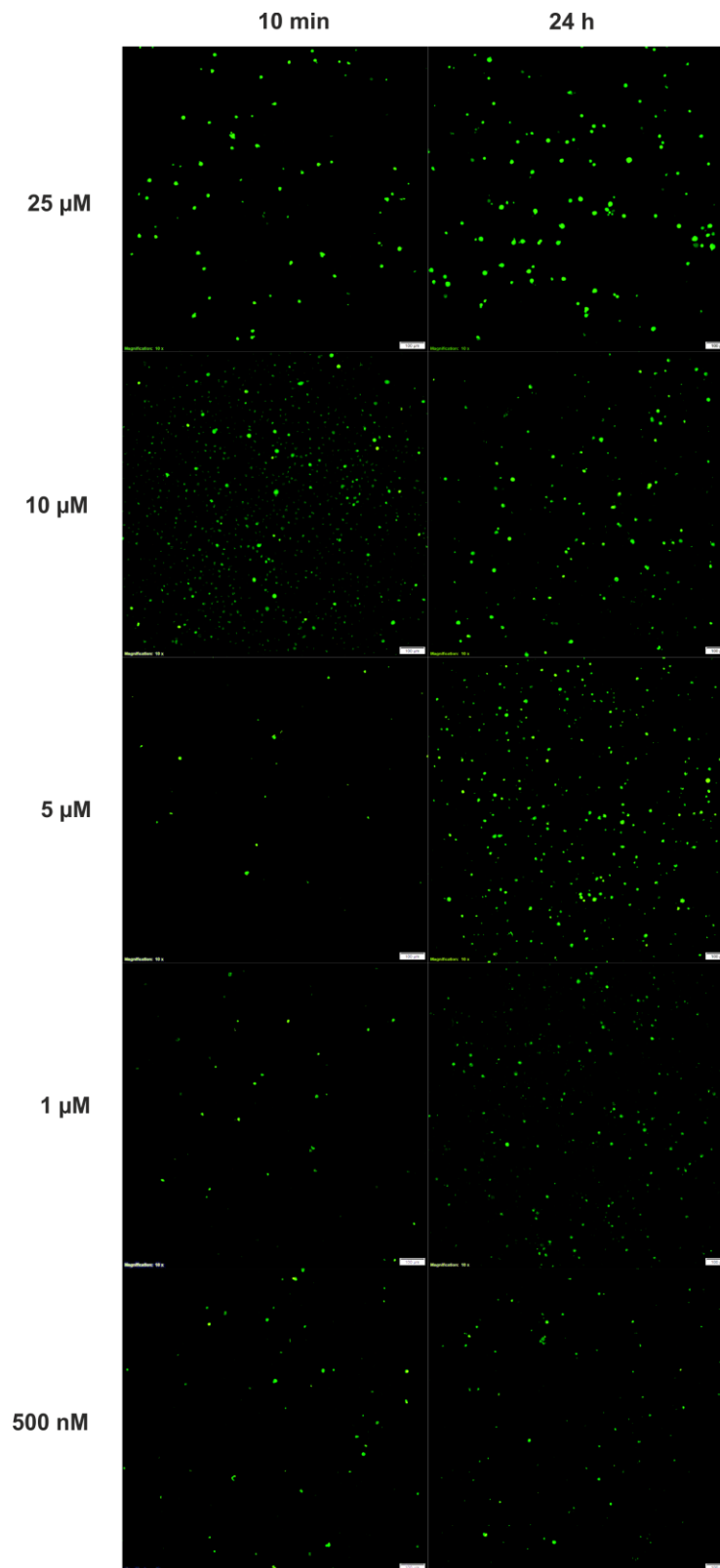
**Tabelle 9.2.3.2** Ct-Werte verschiedener T-Zellen und der GAPDH-Referenzsequenz.

| Quantifizierung      | Ct CDR3 | Ct GAPDH |
|----------------------|---------|----------|
| <b>Jurkat</b>        | 18.01   | 15.32    |
|                      | 18.19   | 15.17    |
|                      | 18.11   | 15.15    |
| <b>Molt-16</b>       | 20.03   | 19.83    |
|                      | 20.47   | 19.95    |
|                      | 20.38   | 18.64    |
| <b>CCRF-CEM</b>      | 16.97   | 15.27    |
|                      | 16.85   | 15.31    |
|                      | 16.75   | 15.03    |
| <b>0.1 ng/well</b>   | -       | 7.09     |
|                      | -       | 7.05     |
|                      | -       | 7.15     |
| <b>0.02 ng/well</b>  | -       | 9.49     |
|                      | -       | 9.51     |
|                      | -       | 9.58     |
| <b>0.004 ng/well</b> | -       | 13.02    |
|                      | -       | 12.71    |
|                      | -       | 12.32    |
| <b>0.008 ng/well</b> | -       | 15.19    |
|                      | -       | 15.33    |
|                      | -       | 16.09    |

Die Echtzeit-PCR wurde mit einem *SYBRGreen™* PCR-Kit durchgeführt.

### 9.2.4 Anhang zu Kapitel 4.2.4

Fluoreszenzbilder der Jurkat-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Molt-16-3-L



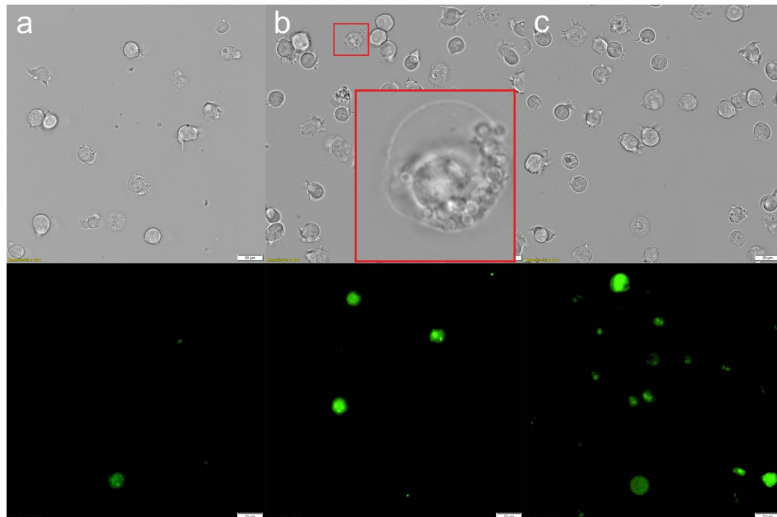
**Abbildung 9.2.4.1** Fluoreszenzbilder der Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von **Molt-16-3-L** nach 10 min und 24 h. Filter: TO =  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ .

### Fluoreszenzbilder nach Elektroporation der Zellen unter verschiedenen Bedingungen

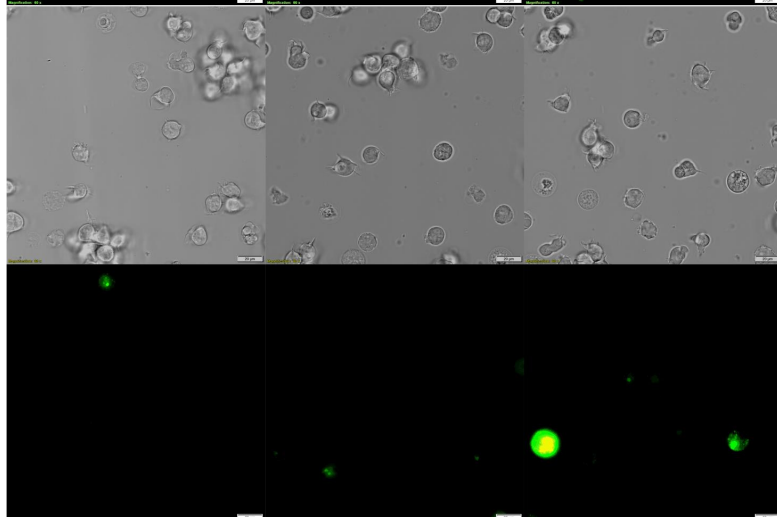
- a) 1325 V, 10 ms, 1 Puls
- b) 1325 V, 10 ms, 3 Pulse
- c) 1400 V, 20 ms, 1 Puls
- d) 1200 V, 10 ms, 1 Puls

Jurkat Zellen

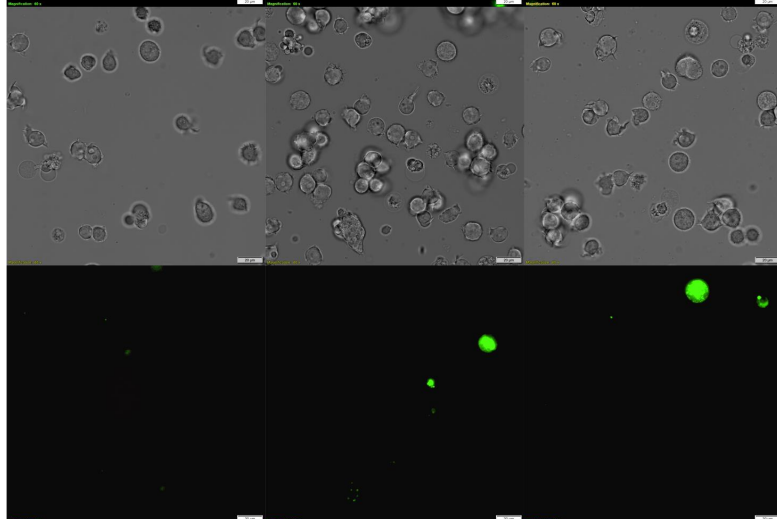
10 min

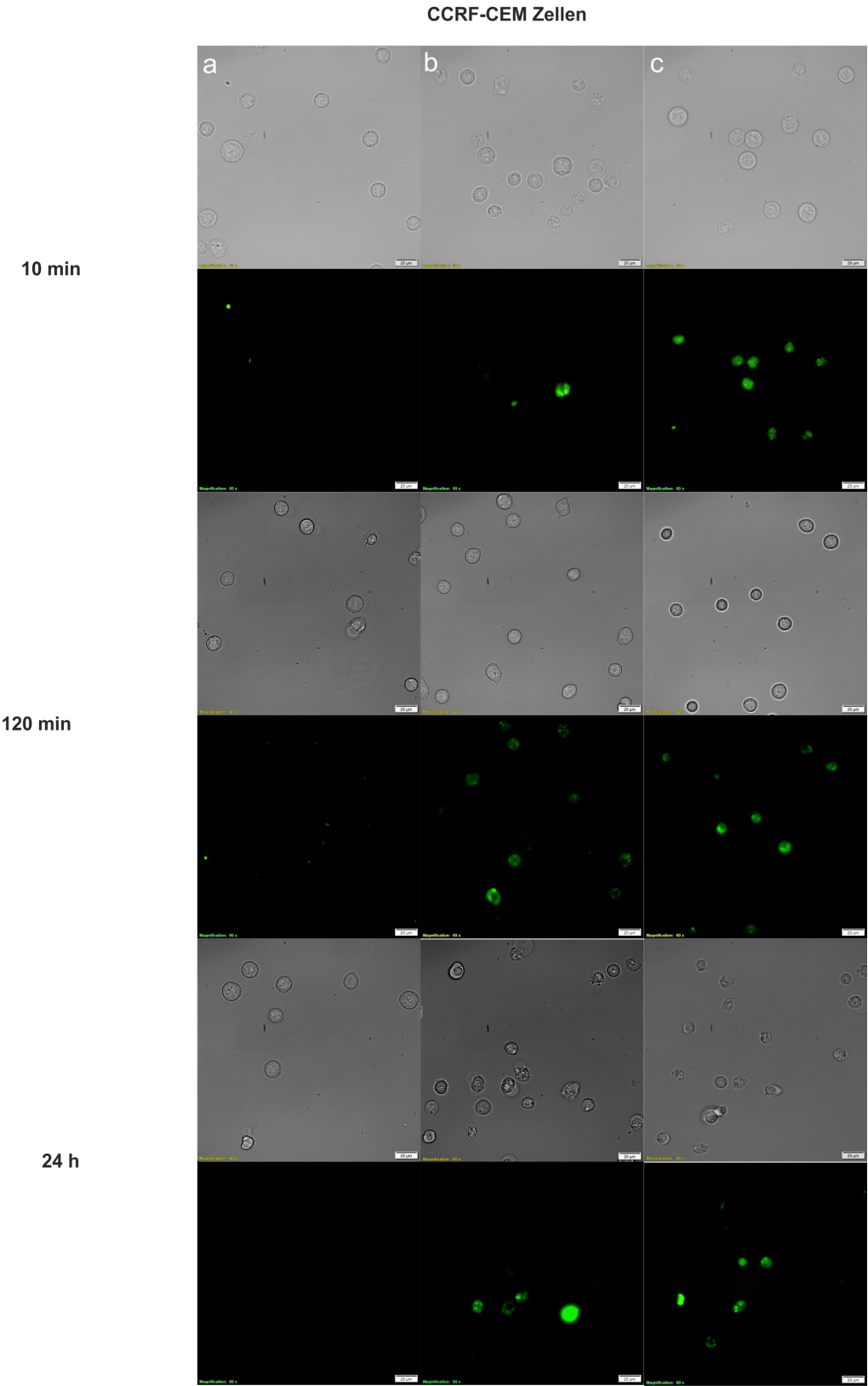


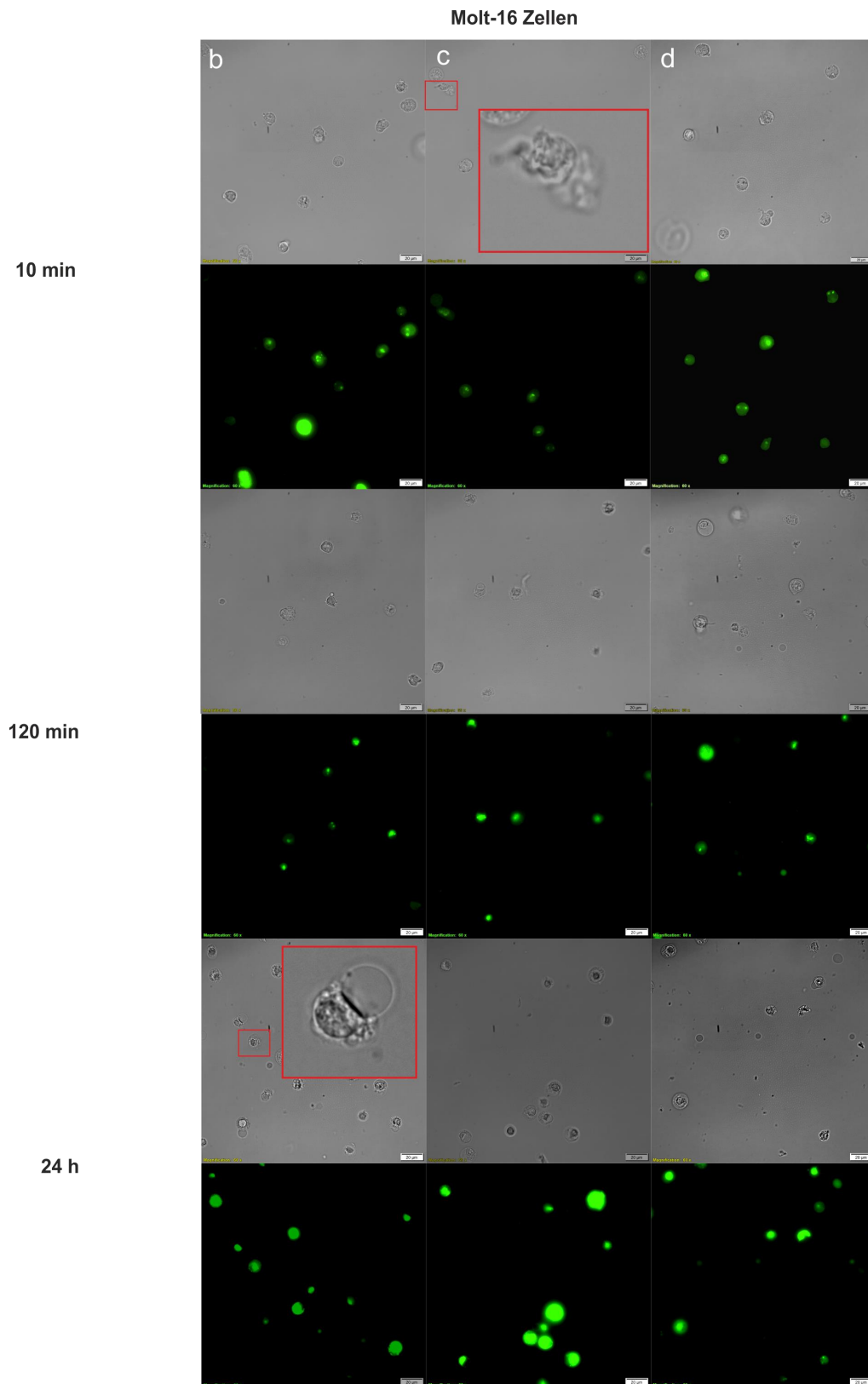
120 min



24 h



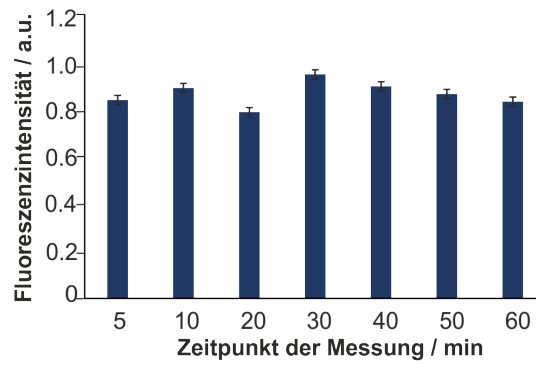




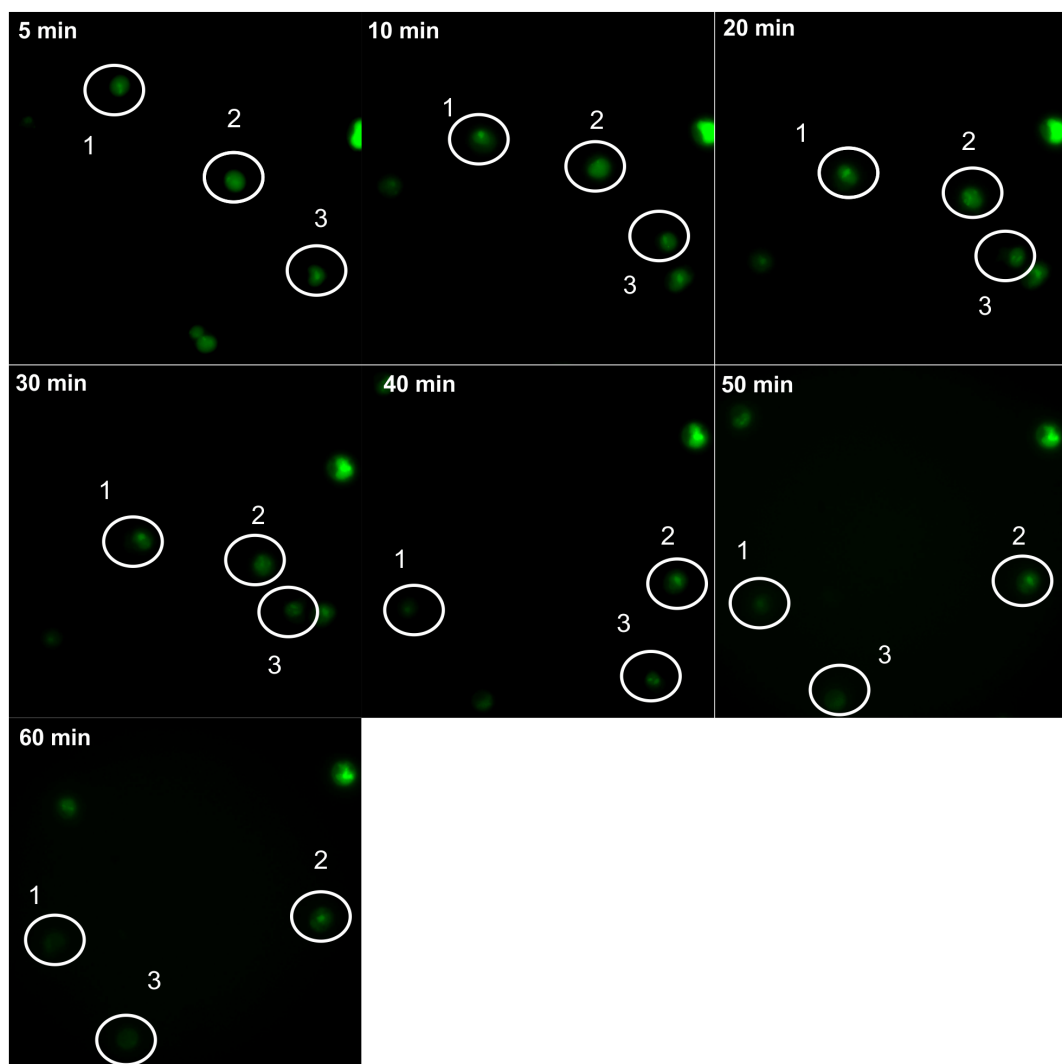
**Abbildung 9.2.4.2** Fluoreszenzbilder der drei verschiedenen T-Zelllinien nach unterschiedlichen Zeitpunkten (10 min, 120 min und 24 h) und unterschiedlichen Bedingungen der Elektroporation. Filter: TO =  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ . Der rote Kasten markiert die beschädigten Zellen.

## Messung der Fluoreszenzintensität über die Zeit

A)



B)

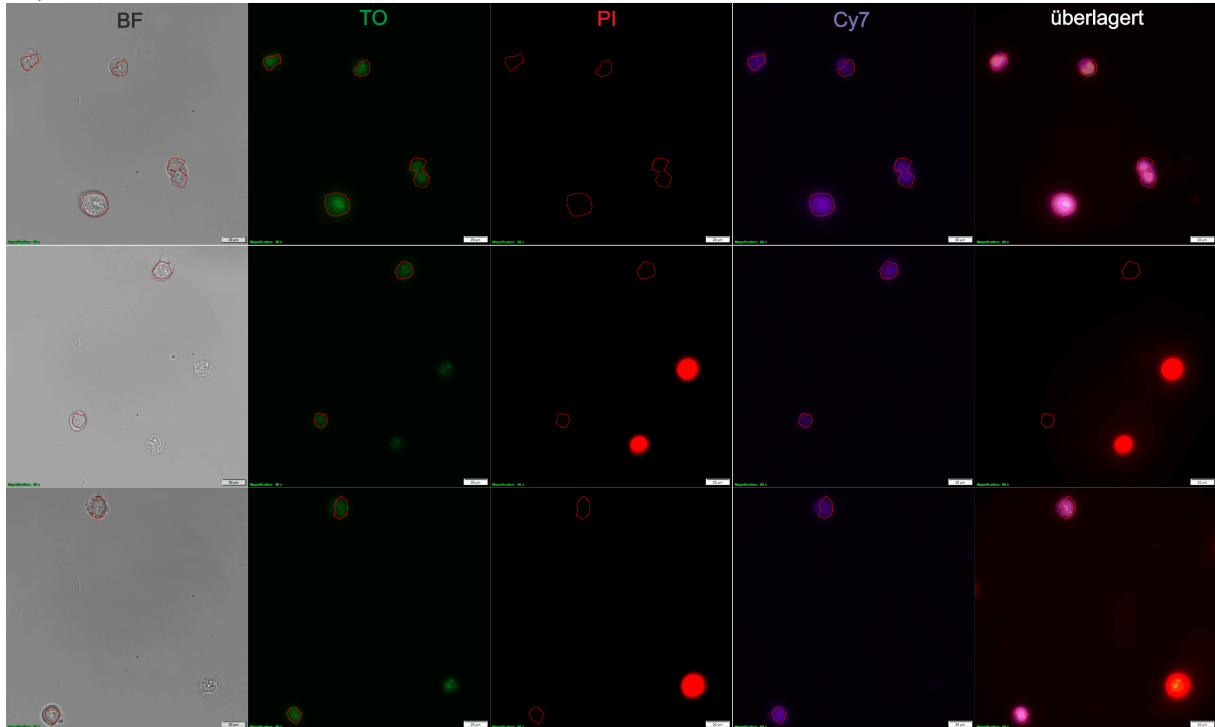


**Abbildung 9.2.4.3** A) Balkendiagramm der Fluoreszenzintensität dreier Jurkat-Zellen nach Elektroporation mit 5  $\mu\text{M}$  Jurkat-1L zu verschiedenen Zeitpunkten. Angegeben ist der normierte Mittelwert mit der Standardabweichung. B) Fluoreszenzbilder der Jurkat-Zellen (Filter: TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ ) gemessen am 60 x Öljektiv mit anschließender ROI-Analyse.

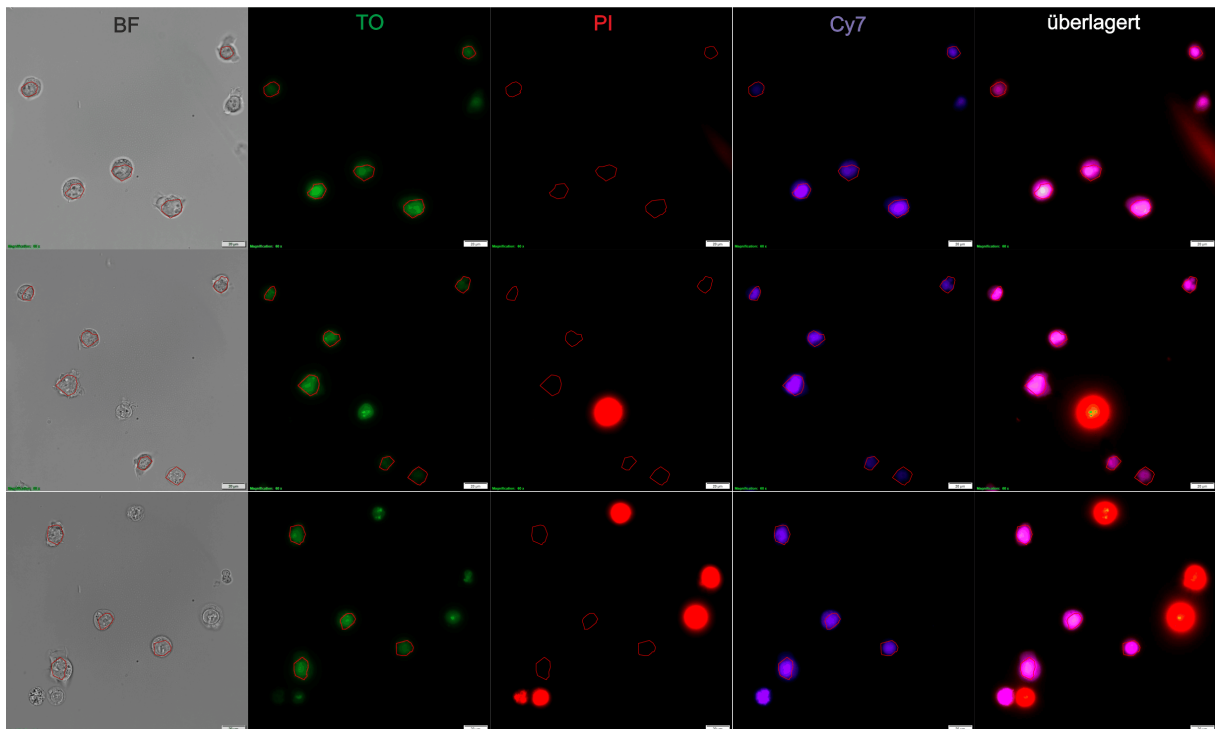
### 9.2.5 Anhang zu Kapitel 4.2.5

#### Fluoreszenzbilder der Jurkat-Zellen nach der ROI-Analyse

##### A) Jurkat-Zellen mit passender Cy7-Sonde



##### B) Jurkat-Zellen mit nicht-passender Cy7-Sonde

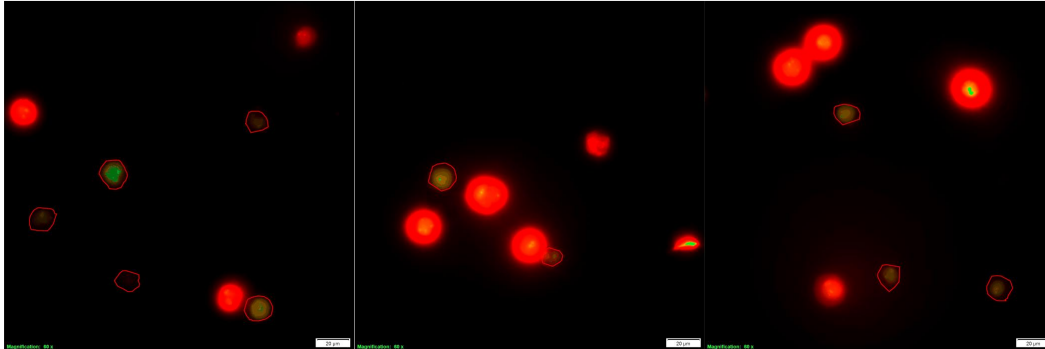


**Abbildung 9.2.5.1** Hellfeld- und Fluoreszenzbilder der Jurkat-Zellen nach kompetitiver Hybridisierung mit FIT-Sonden und Cy7-Sonden und der Analyse durch ROI. Es sind jeweils die einzelnen Fluoreszenzkanäle sowie ein überlagertes Bild aller Fluoreszenzkanäle abgebildet. Für eine bessere Darstellungen wurden die Kontraste verändert. Die Analysedaten wurden jedoch aus den Rohdaten bezogen. Grün = TO-FIT-Sonde, rot = Propidiumiodid, violett = Cy7-Sonde. Filter: TO =  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40$  nm, PI =  $\lambda_{\text{ex}} = 575/25$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 628/40$  nm, Cy7:  $\lambda_{\text{ex}} = 740/75$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 810/90$  nm, Skala = 20  $\mu\text{m}$ .

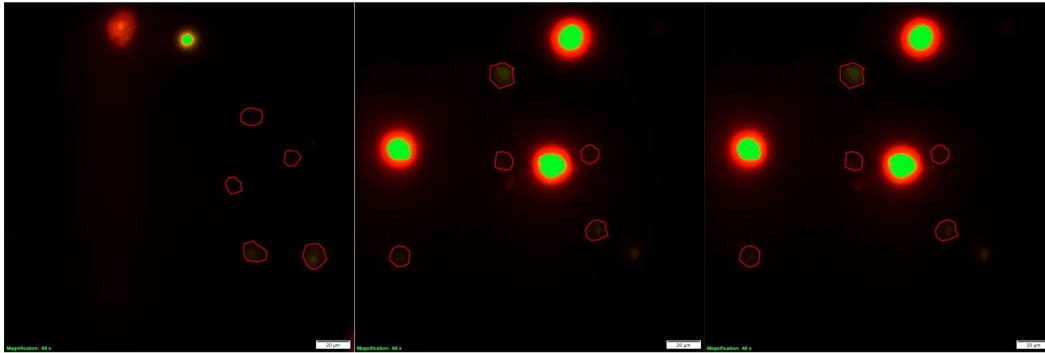
## 9.2.6 Anhang zu Kapitel 4.2.6

### Fluoreszenzbilder der Jurkat- und Molt-16-Zellen

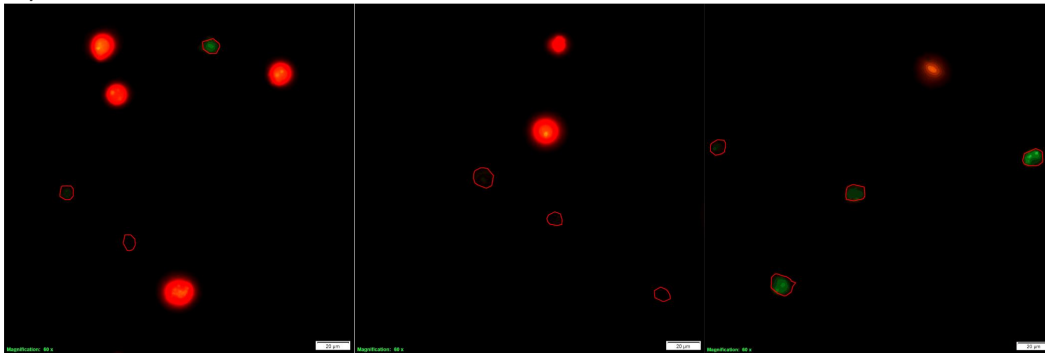
A) Jurkat-Zellen mit Jurkat-3-L



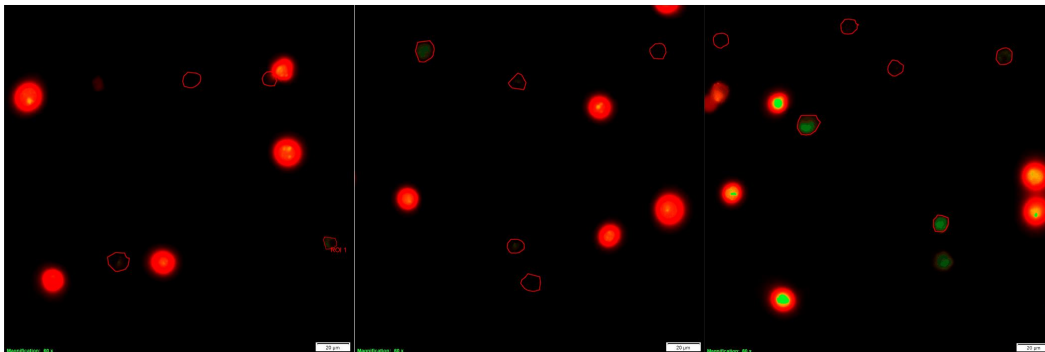
B) Jurkat-Zellen mit Molt-16-3-L



C) Molt-16-Zellen mit Molt-16-3-L



D) Molt-16-Zellen mit Jurkat-3-L



**Abbildung 9.2.6.1** Überlagerte Fluoreszenzbilder (TO- und PI-Kanal) der Jurkat- und Molt-16-Zellen nach der Analyse durch ROI. Grün = TO-FIT-Sonde, rot = Propidiumiodid. Für eine bessere Darstellungen wurden die Kontraste verändert. Die Analysedaten wurden jedoch aus den Rohdaten bezogen. Filter: TO =  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ , PI =  $\lambda_{\text{ex}} = 575/25 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 628/40 \text{ nm}$ , Skala =  $20 \mu\text{m}$ .



## 9.2.7 Anhang zu Kapitel 4.2.7

## Fluoreszenzdaten der TO-Cy7-Sonden

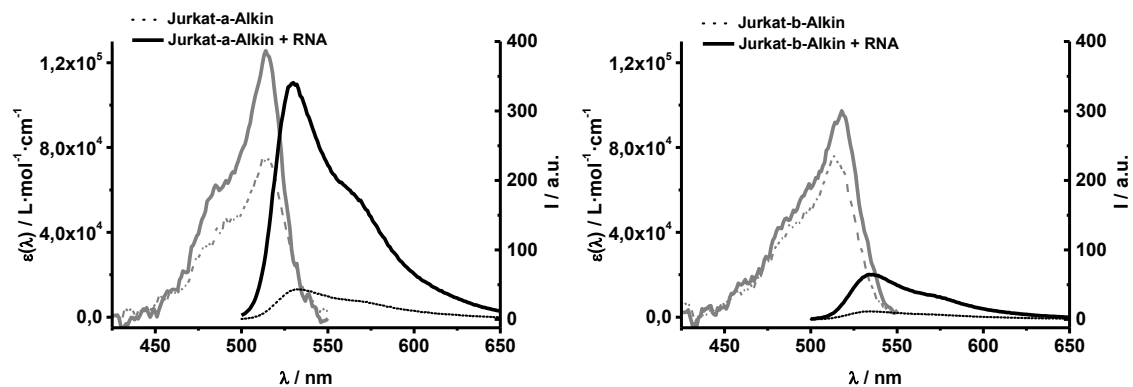
Tabelle 9.2.7.1 Fluoreszenzdaten der TO-Cy7-Sonden.

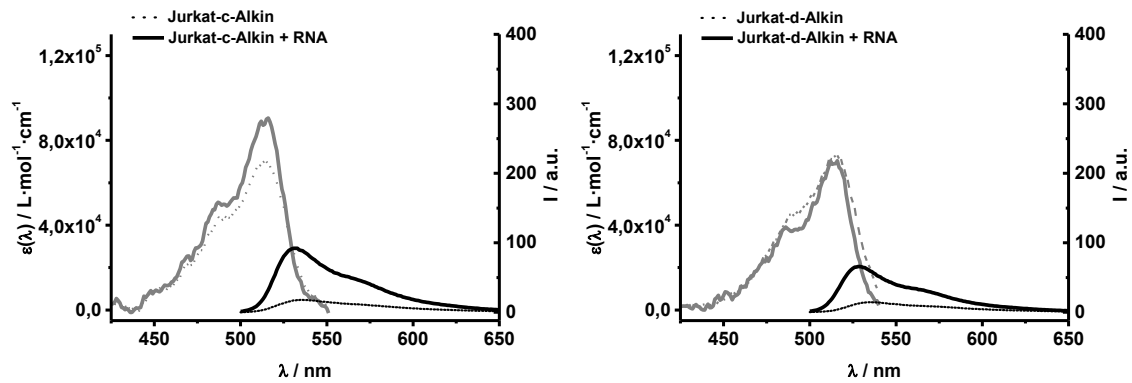
| Sonden         | $I_0$ | $I$ | $I/I_0$ | $\epsilon^a$<br>(485nm) | $\Phi_0$ | $\Phi$ | $\Phi/\Phi_0$ | Br<br>(485nm) |
|----------------|-------|-----|---------|-------------------------|----------|--------|---------------|---------------|
| Molt-16-a-Cy7  | 9     | 45  | 5       | 41362                   | 0.01     | 0.03   | 3.0           | 1.2           |
| Molt-16-b-Cy7  | 2.6   | 14  | 5.3     | 41449                   | 0.01     | 0.02   | 2.0           | 0.8           |
| Molt-16-c-Cy7  | 15    | 103 | 6.8     | 34651                   | 0.05     | 0.21   | 4.2           | 7.2           |
| Jurkat-e-Cy7   | 3.1   | 21  | 6.7     | 24292                   | 0.01     | 0.02   | 2.0           | 0.5           |
| Jurkat-f-Cy7   | 6.7   | 98  | 15      | 40244                   | 0.01     | 0.18   | 18            | 0.7           |
| Jurkat-g-Cy7   | 3.4   | 28  | 8.2     | 32510                   | 0.02     | 0.06   | 3.0           | 1.9           |
| CCRF-CEM-a-Cy7 | 1.8   | 114 | 63      | 24007                   | 0.01     | 0.32   | 3.2           | 4.8           |
| CCRF-CEM-b-Cy7 | 7.9   | 41  | 5.2     | 21022                   | 0.02     | 0.09   | 4.5           | 1.8           |
| CCRF-CEM-c-Cy7 | 16    | 76  | 4.7     | 37987                   | 0.05     | 0.17   | 3.4           | 6.4           |

Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37°C. TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ , Cy7:  $\lambda_{\text{em}} = 773 \text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$ .

## Absorptions- und Emissionsspektren der dualen FIT-Sonden

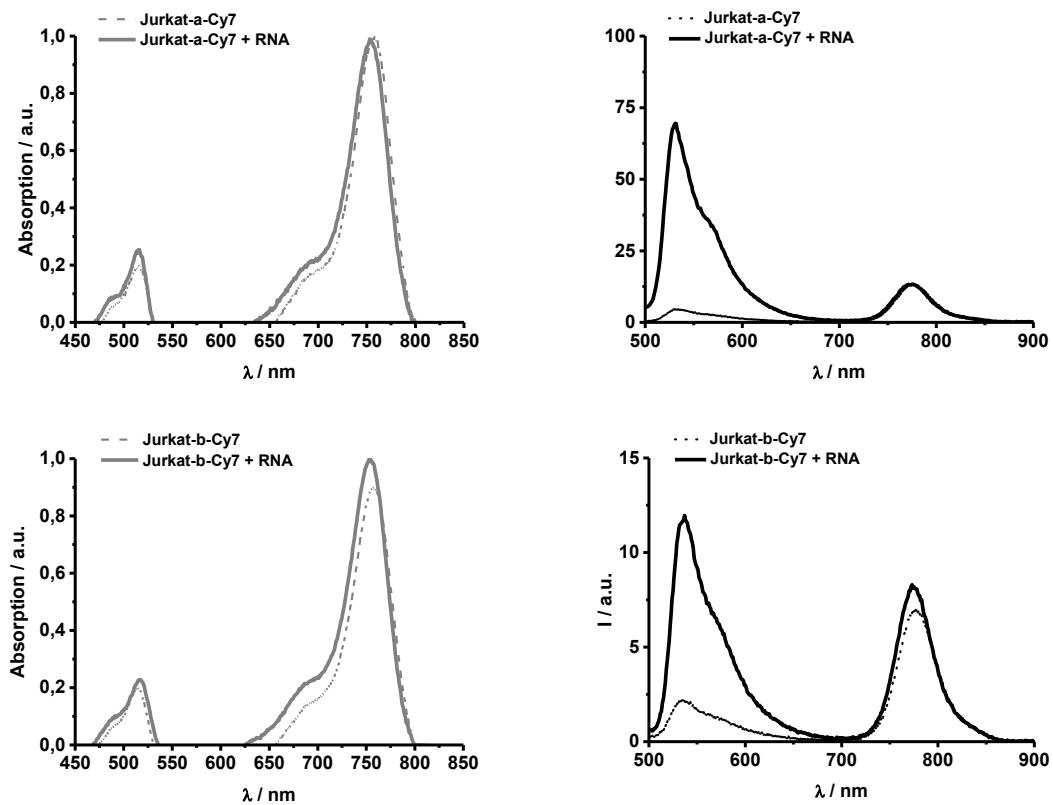
## Jurkat-Alkin

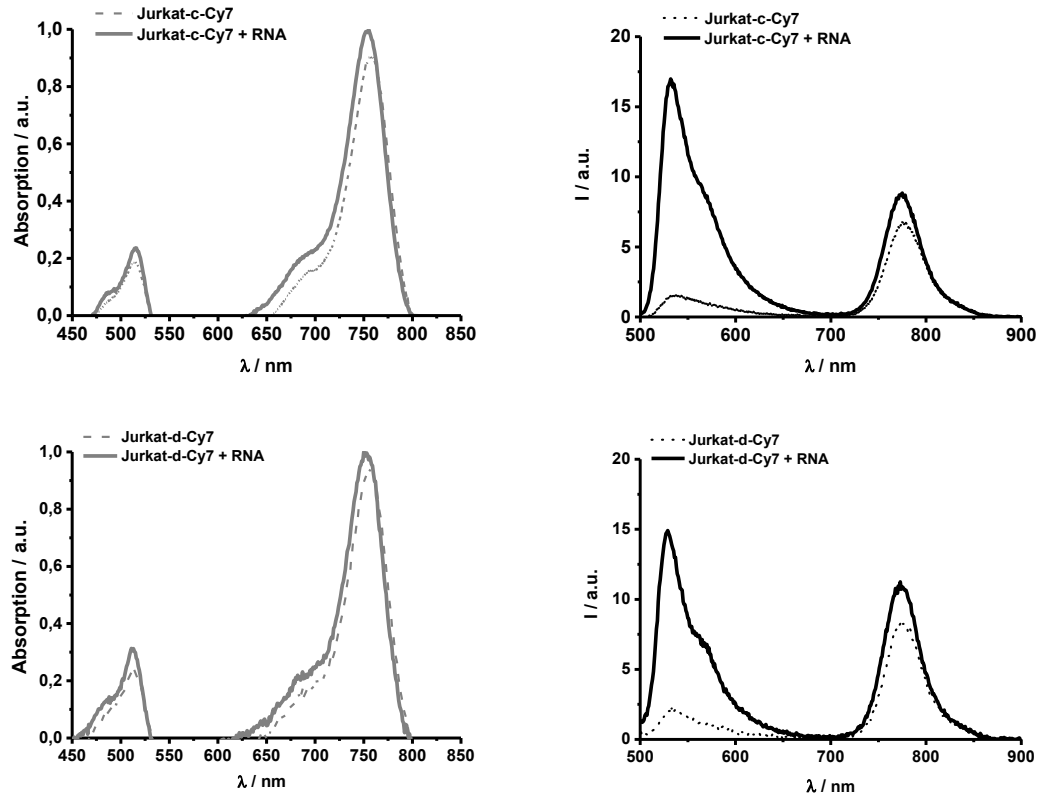




**Abbildung 9.2.7.1** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der Alkin-FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37 °C in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 - 650 \text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$ .

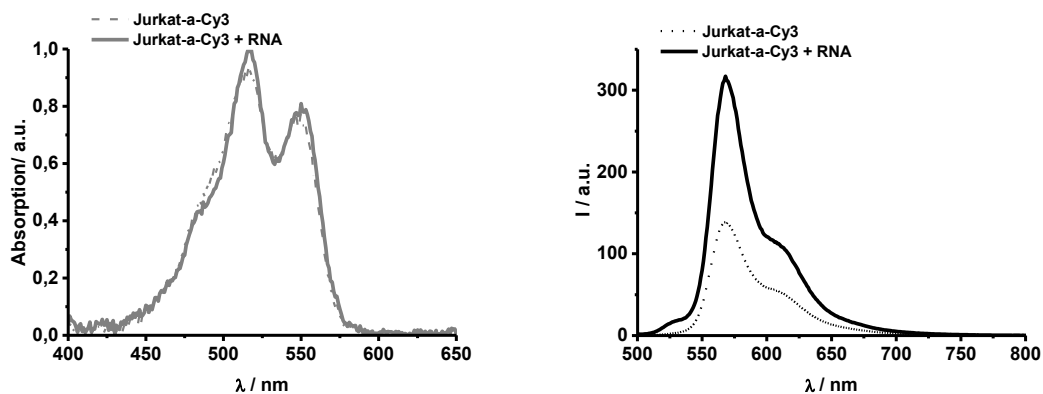
### Jurkat-Cy7

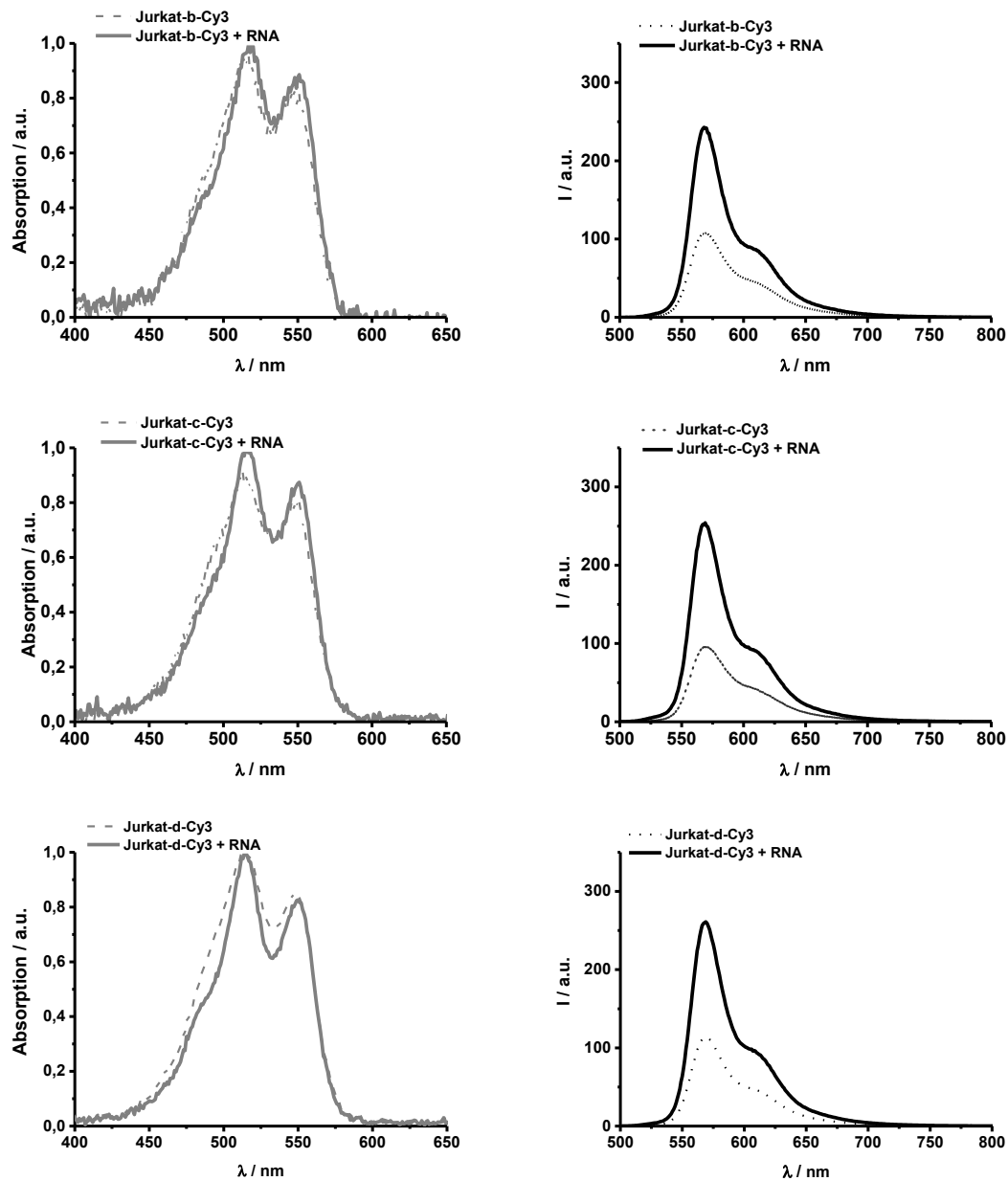




**Abbildung 9.2.7.2** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der Cy7-FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5  $\mu$ M Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37 °C in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 850 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

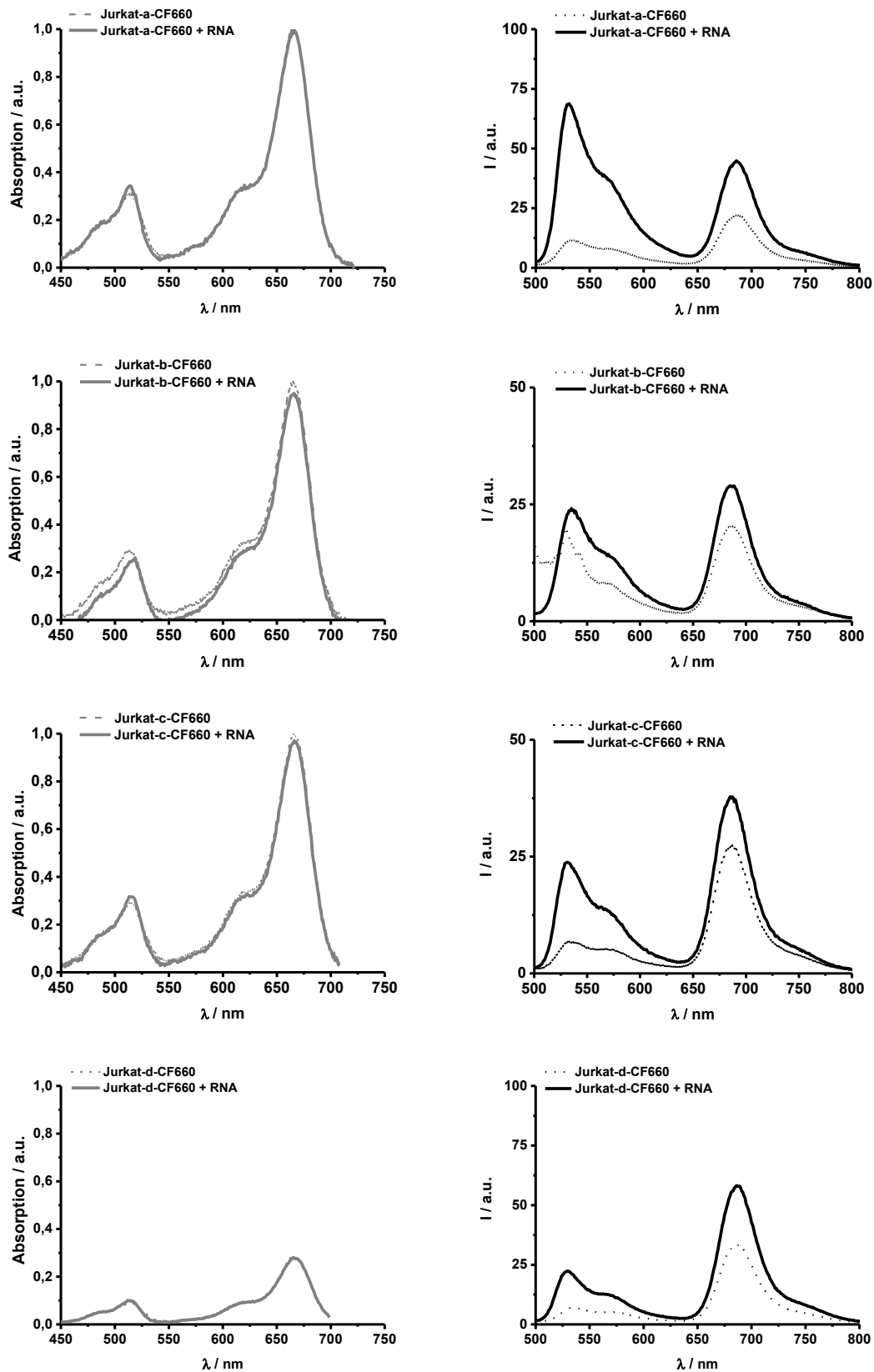
### Jurkat-Cy3





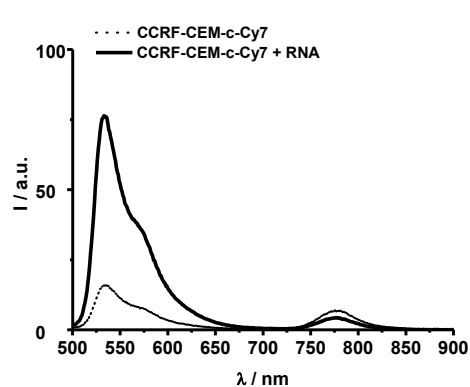
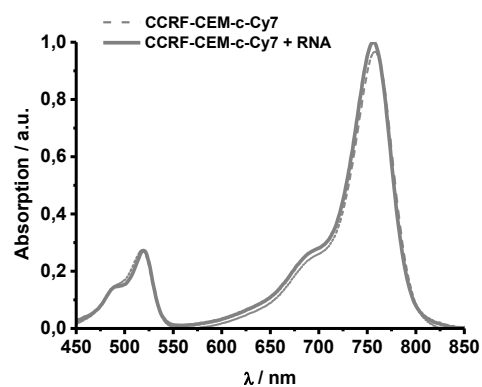
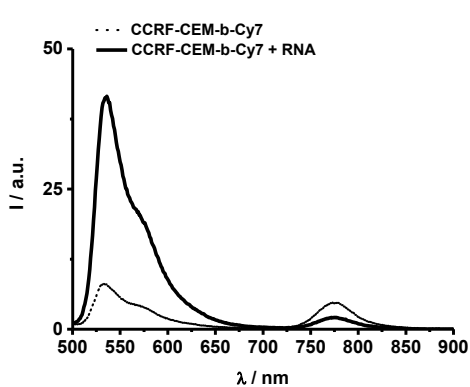
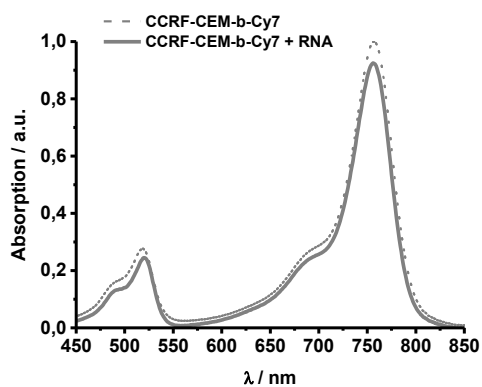
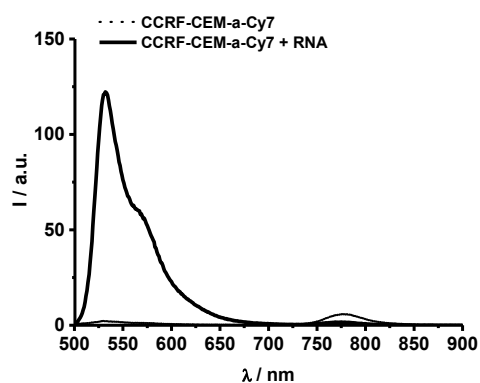
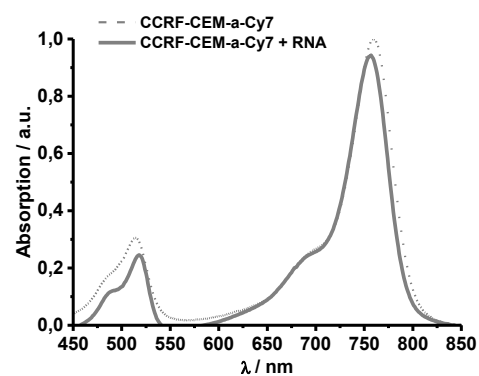
**Abbildung 9.2.7.3** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der Cy3-FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5 Äq. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7) bei 37 °C in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 650 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

## Jurkat-CF660

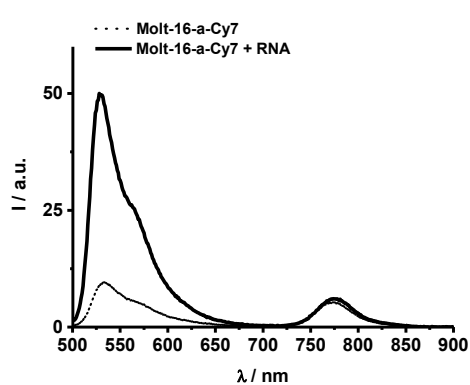
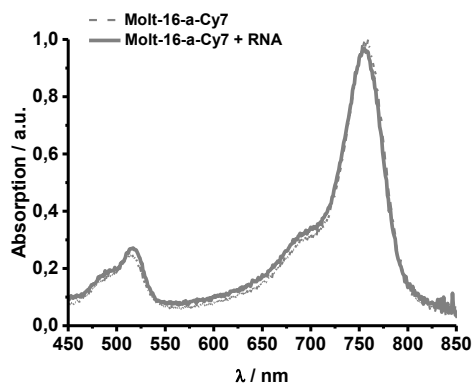


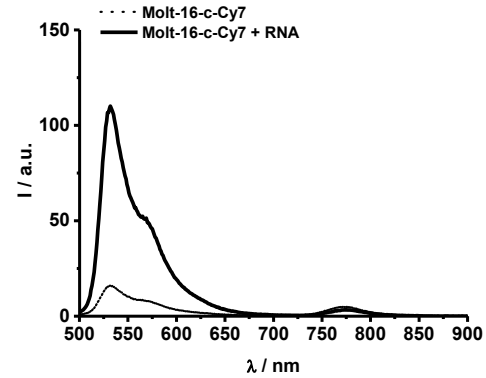
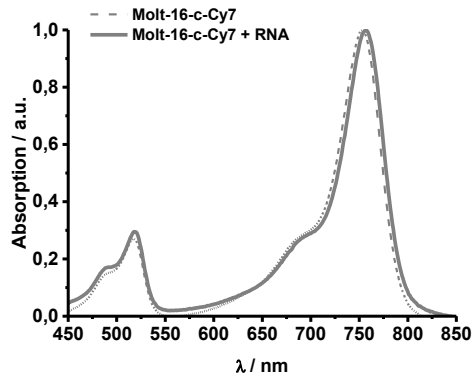
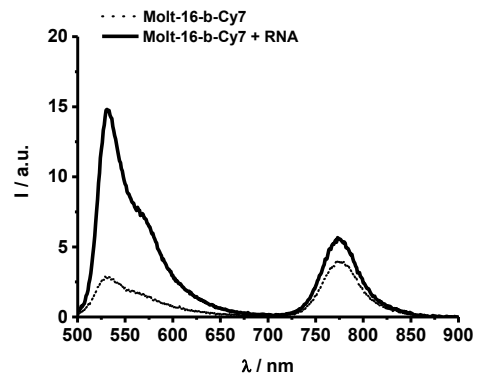
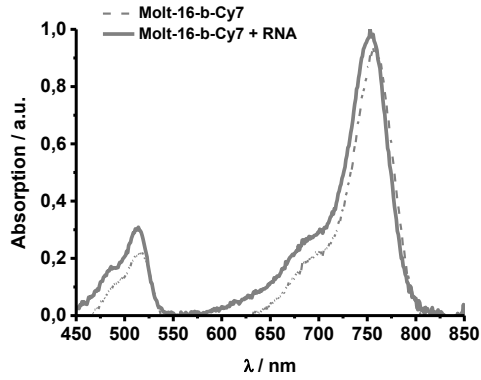
**Abbildung 9.2.7.4** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der CF660-FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37  $^\circ\text{C}$  in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 800 nm,  $\text{slit}_{\text{ex}}$  = 5 nm,  $\text{slit}_{\text{em}}$  = 5 nm.

## CCRF-CEM-Cy7

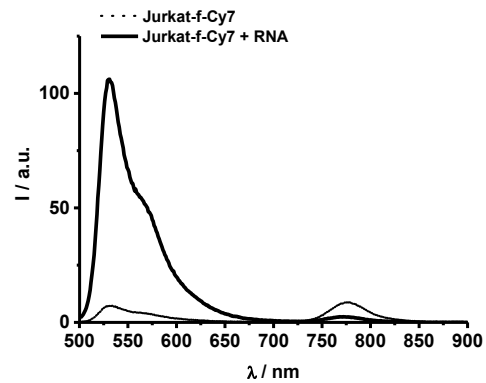
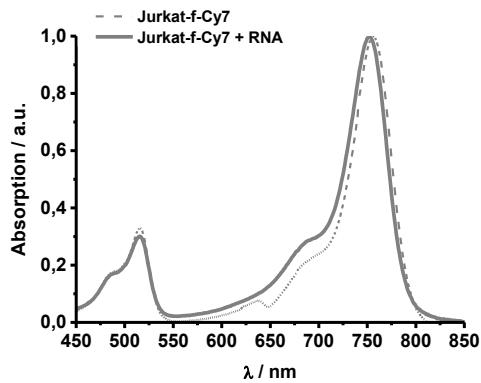
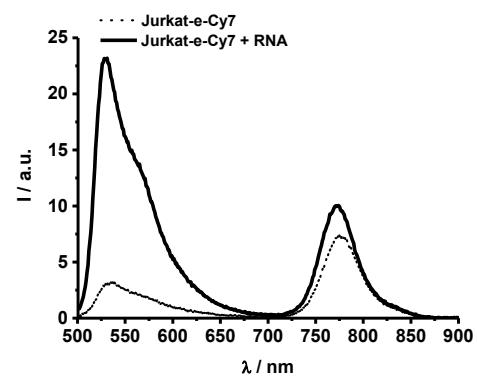
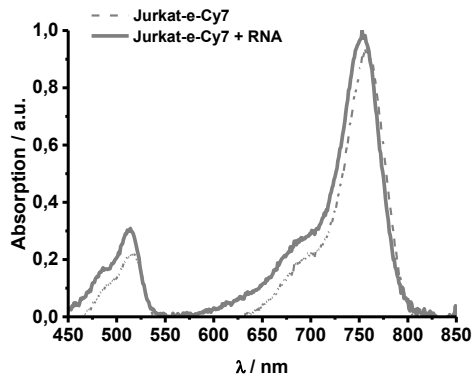


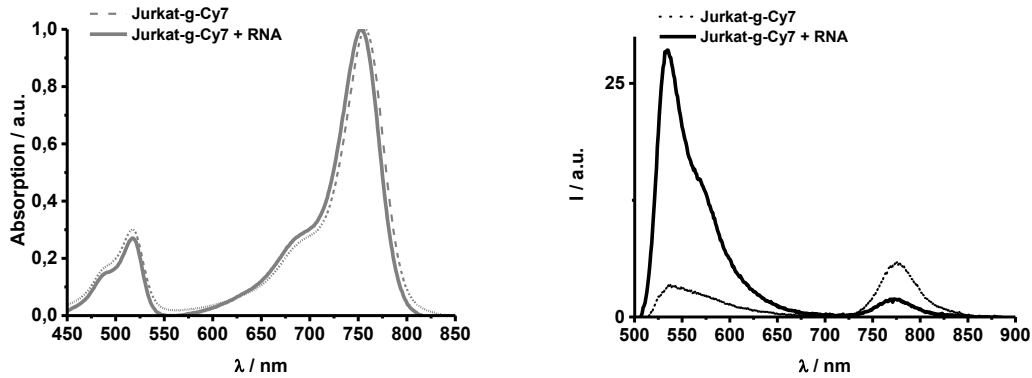
## Molt-16-Cy7





Jurkat-Cy7

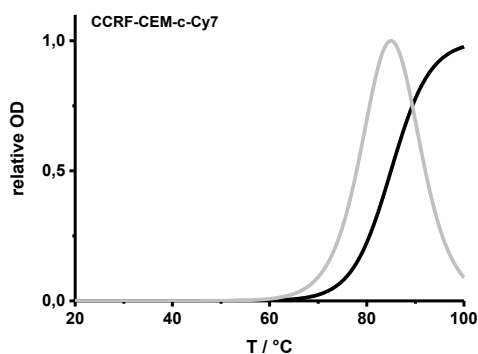
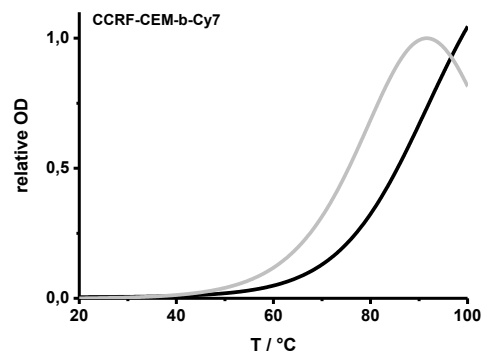
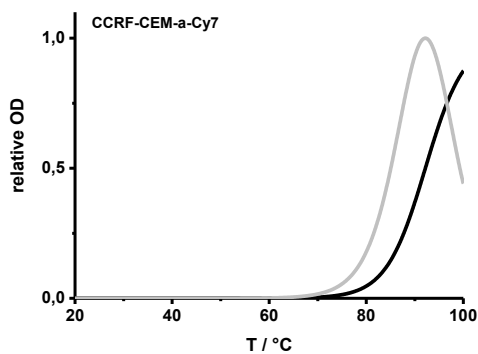




**Abbildung 9.2.7.5** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der Cy7-FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37  $^\circ\text{C}$  in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 850 nm,  $\text{slit}_{\text{ex}}$  = 5 nm,  $\text{slit}_{\text{em}}$  = 5 nm.

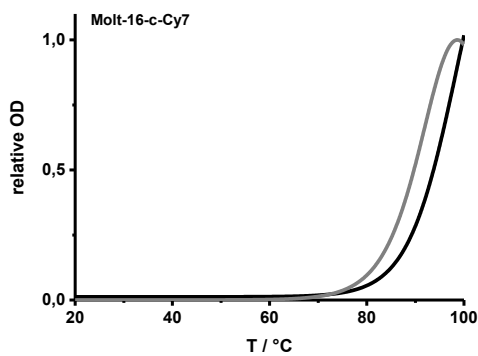
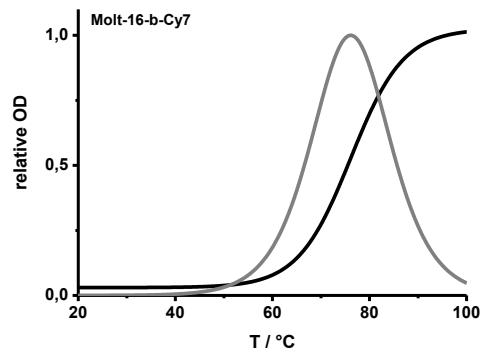
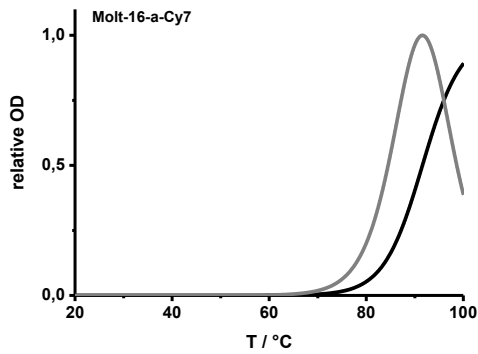
## Schmelzkurven der TO-Cy7-Sonden

### CCRF-CEM

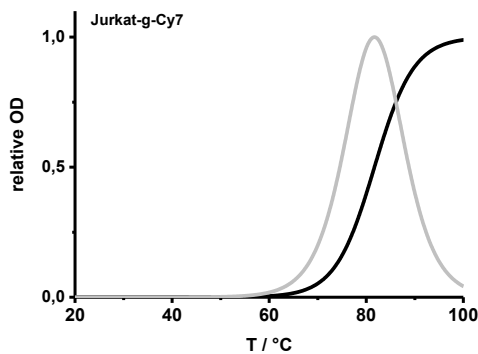
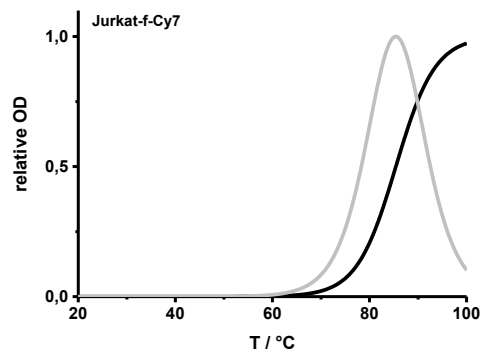
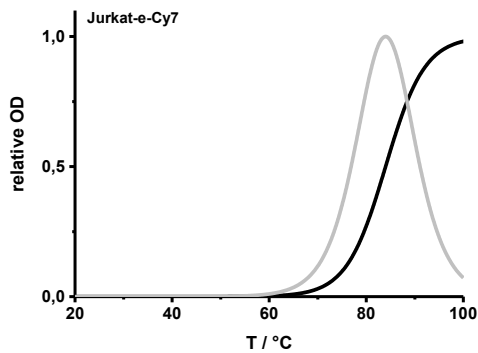




Molt-16



Jurkat



**Abbildung 9.2.7.6** Schmelzkurven (schwarz) und die Ableitungen (grau). Bedingungen: 1 oder 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 1 Äq. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7), in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); 20 - 100 °C.  $\lambda_{\text{em}} = 260 \text{ nm}$ .

### 9.2.8 Anhang zu Kapitel 4.2.8

#### PCR-Daten der Stimulationsversuche mit PMA

**Tabelle 9.2.8.1** Ct-Werte stimulierter Jurkat-Zellen über 6 h.

| Jurkat 6 h | Ct CDR3 | Ct GAPDH |
|------------|---------|----------|
| 0 ng/ml    | 18.01   | 15.32    |
|            | 18.19   | 15.17    |
|            | 18.11   | 15.15    |
| 3 ng/ml    | 17.68   | 15.11    |
|            | 17.23   | 15.27    |
|            | 17.44   | 15.95    |
| 10 ng/ml   | 18.66   | 15.95    |
|            | 18.37   | 16.26    |
|            | 18.62   | 16.34    |
| 30 ng/ml   | 17.82   | 16.63    |
|            | 18.05   | 16.11    |
|            | 17.95   | 16.15    |
| 50 ng/ml   | 18.93   | 17.21    |
|            | 18.95   | 16.83    |
|            | 18.93   | 16.81    |
| 100 ng/ml  | 17.39   | 14.95    |
|            | 17.3    | 14.88    |
|            | 17.08   | 16.19    |

**Tabelle 9.2.8.2** Ct-Werte stimulierter Jurkat-Zellen über 12 h.

| Jurkat 12 h | Ct CDR3 | Ct GAPDH |
|-------------|---------|----------|
| 0 ng/ml     | 17.71   | 15.37    |
|             | 19.18   | 15.45    |
|             | 17.96   | 15.43    |
| 3 ng/ml     | 16.73   | 16.18    |
|             | 16.84   | 15.87    |
|             | 17.05   | 16.04    |
| 10 ng/ml    | 17.43   | 16.14    |
|             | 17.29   | 15.99    |
|             | 17.68   | 15.99    |
| 30 ng/ml    | 17.71   | 16.77    |
|             | 17.9    | 16.73    |
|             | 17.82   | 16.71    |
| 50 ng/ml    | 17.55   | 16.4     |
|             | 17.51   | 16.22    |
|             | 17.6    | 16.22    |
| 100 ng/ml   | 17.14   | 15.88    |
|             | 16.92   | 15.39    |
|             | 16.97   | 16.66    |

**Tabelle 9.2.8.3** Ct-Werte stimulierter Jurkat-Zellen über 12 h.

| 2. Jurkat 12h | Ct CDR3 | Ct GAPDH |
|---------------|---------|----------|
| 0 ng/ml       | 18.22   | 15.19    |
|               | 19.6    | 14.86    |
|               | 18.11   | 16.26    |
| 3 ng/ml       | 16.73   | 15.96    |
|               | 16.55   | 15.82    |
|               | 16.85   | 16.2     |
| 10 ng/ml      | 19.4    | 18.56    |
|               | 19.46   | 18.69    |
|               | 19.53   | 19.42    |
| 30 ng/ml      | 19.96   | 19.05    |
|               | 20.4    | 19.08    |
|               | 20.43   | 19.94    |

Die Echtzeit-PCR wurde mit einem SYBRGreen™ PCR-Kit durchgeführt.

**Tabelle 9.2.8.4** Ct-Werte stimulierter Jurkat-Zellen über 24 h.

| Jurkat 24 h | Ct CDR3 | Ct GAPDH |
|-------------|---------|----------|
| 0 ng/ml     | 17.32   | 15.44    |
|             | 17.24   | 15.39    |
|             | 17.09   | 16.11    |
| 3 ng/ml     | 16.94   | 18.14    |
|             | 16.72   | 15.83    |
|             | 16.97   | 15.66    |
| 10 ng/ml    | 17.14   | 16.13    |
|             | 17.21   | 16.17    |
|             | 17.33   | 16.33    |
| 30 ng/ml    | 17.44   | 16.41    |
|             | 17.54   | 16.22    |
|             | 17.52   | 16.71    |
| 50 ng/ml    | 17.56   | 16.54    |
|             | 17.5    | 16.52    |
|             | 17.52   | 16.6     |
| 100 ng/ml   | 17.31   | 15.82    |
|             | 17.26   | 15.66    |
|             | 17.19   | 15.88    |

**Tabelle 9.2.8.5** Ct-Werte stimulierter CCRF-CEM-Zellen nach 12 h.

| CCRF-CEM 12 h | Ct CDR3 | Ct GAPDH |
|---------------|---------|----------|
| 0 ng/ml       | 17.57   | 15.76    |
|               | 16.84   | 15.44    |
|               | 17.65   | 16.39    |
| 3 ng/ml       | 16.85   | 16.75    |
|               | 16.85   | 16.1     |
|               | 16.49   | 16.4     |
| 10 ng/ml      | 16.33   | 16.18    |
|               | 16.28   | 15.79    |
|               | 16.45   | 15.95    |
| 30 ng/ml      | 17.48   | 16.03    |
|               | 17.63   | 15.98    |
|               | 17.65   | 16.14    |
| 50 ng/ml      | 16.61   | 15.64    |
|               | 15.82   | 15.61    |
|               | 16.12   | 15.82    |
| 100 ng/ml     | 17.77   | 17.03    |
|               | 17.35   | 17.2     |
|               | 17.6    | 17.36    |

**Tabelle 9.2.8.6** Ct-Werte stimulierter CCRF-CEM-Zellen über 12 h.

| 2. CCRF-CEM 12 h | Ct CDR3 | Ct GAPDH |
|------------------|---------|----------|
| 0 ng/ml          | 16.97   | 15.27    |
|                  | 16.85   | 15.31    |
|                  | 16.75   | 15.03    |
| 3 ng/ml          | 18.34   | 17.98    |
|                  | 18.09   | 17.92    |
|                  | 18.18   | 18.06    |
| 10 ng/ml         | 16.18   | 16.41    |
|                  | 16.24   | 16.24    |
|                  | 16.11   | 16.52    |
| 30 ng/ml         | 16.83   | 17.14    |
|                  | 16.77   | 17.2     |
|                  | 17.02   | 17.18    |

Die Echtzeit-PCR wurde mit einem SYBRGreen™ PCR-Kit durchgeführt.

## 9.2 Anhang zu Kapitel 4.2

**Tabelle 9.2.8.7** Ct-Werte behandelter Jurkat-Zellen über 12 h.

| Jurkat 12 h            | Ct CDR3 | Ct GAPDH |
|------------------------|---------|----------|
| 0 ng/ml                | 19.07   | 15.67    |
|                        | 18.91   | 15.81    |
|                        | 18.98   | 15.67    |
| 3 ng/ml                | 17.09   | 16.06    |
|                        | 17.24   | 16.18    |
|                        | 17.17   | 16.07    |
| DMSO                   | 18.83   | 15.57    |
|                        | 19.25   | 15.51    |
|                        | 19.69   | 15.43    |
| -FCS/+FCS/<br>+3 ng/ml | 17.31   | 15.9     |
|                        | 17.59   | 15.8     |
|                        | 17.58   | 16.03    |
| -FCS/+FCS/<br>+DMSO    | 18.32   | 17.21    |
|                        | 18.14   | 16.88    |
|                        | 18.09   | 16.85    |
| -FCS/+FCS              | 17.7    | 16.74    |
|                        | 17.69   | 16.9     |
|                        | 19.11   | 16.87    |

**Tabelle 9.2.8.8** Ct-Werte behandelter CCRF-CEM-Zellen über 12 h.

| CEM 12 h               | Ct CDR3 | Ct GAPDH |
|------------------------|---------|----------|
| 0 ng/ml                | 17.2    | 15.95    |
|                        | 17.12   | 16.03    |
|                        | 17.06   | 16.01    |
| 3 ng/ml                | 16.8    | 15.95    |
|                        | 16.88   | 15.97    |
|                        | 16.79   | 16.03    |
| DMSO                   | 18.13   | 16.05    |
|                        | 18.16   | 16.05    |
|                        | 18      | 15.88    |
| -FCS/+FCS/<br>+3 ng/ml | 16.72   | 16.18    |
|                        | 16.77   | 16.35    |
|                        | 17.46   | 16.38    |
| -FCS/+FCS/<br>+DMSO    | 16.91   | 16.14    |
|                        | 17.29   | 16.14    |
|                        | 17.14   | 16.23    |
| -FCS/+FCS              | 17.41   | 16.67    |
|                        | 17.62   | 16.92    |
|                        | 17.2    | 15.95    |

**Tabelle 9.2.8.9** Ct-Werte behandelter Jurkat-Zellen über 12 h.

| Jurkat 12 h<br>-FCS | Ct CDR3 | Ct GAPDH |
|---------------------|---------|----------|
| 0 ng/ml             | 19.34   | 16.22    |
|                     | 19.45   | 16.5     |
|                     | 19.13   | 16.16    |
| -FCS                | 18.66   | 16.14    |
|                     | 18.53   | 16.09    |
|                     | 18.56   | 16.2     |

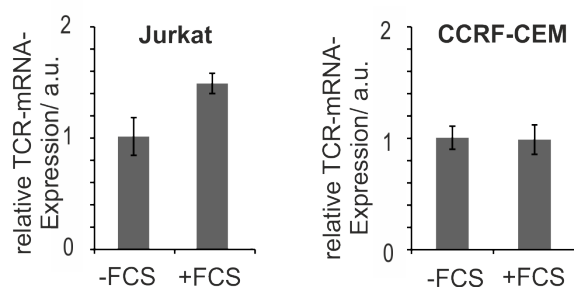
**Tabelle 9.2.8.10** Ct-Werte behandelter CCRF-CEM-Zellen über 12 h.

| CCRF-CEM 12 h<br>-FCS | Ct CDR3 | Ct GAPDH |
|-----------------------|---------|----------|
| 0 ng/ml               | 17.78   | 16.37    |
|                       | 17.88   | 16.1     |
|                       | 17.79   | 16.29    |
| -FCS                  | 17.5    | 16.06    |
|                       | 17.74   | 16.08    |
|                       | 17.86   | 16.18    |

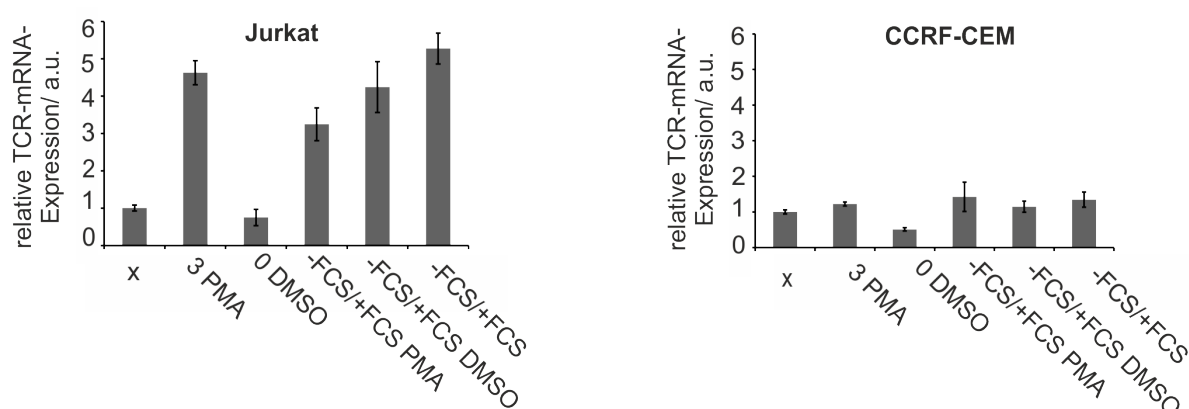
Die Echtzeit-PCR wurde mit einem *SYBRgreen*<sup>TM</sup> PCR-Kit durchgeführt.

## Ergebnisse der PCR nach Kombinationen aus Aushungern und Stimulation der Zellen

A)



B)



**Abbildung 9.2.8.1** A) PCR-Ergebnisse der Jurkat-Zellen und CCRF-CEM-Zellen nach Aushungern über 12 h (-FCS) und Zugabe von FCS über 12 h (+FCS). B) PCR-Ergebnisse der Jurkat-Zellen und CCRF-CEM-Zellen ohne Behandlung (x), Nach Zugabe von 3 ng/ml PMA über 12 h (3 PMA), nach Zugabe von DMSO im gleichen Volumen wie bei der Stimulation (0 DMSO), nach Aushungern über 12 h und anschließende Zugabe von FCS und 3 ng/ml PMA über 12 h (-FCS/+FCS PMA), nach Aushungern über 12 h und anschließende Zugabe von FCS und DMSO (-FCS/+FCS DMSO) und dem Aushungern über 12 h und anschließender Zugabe von FCS über 12 h (-FCS/+FCS). Die Echtzeit-PCR wurde mit einem SYBRgreen<sup>TM</sup> PCR-Kit durchgeführt.

### 9.2.9 Anhang zu Kapitel 4.2.9

#### Fluoreszenzdaten der TO-Cy7-Sonden

**Tabelle 9.2.9.1** Fluoreszenzdaten der TO-Cy7-FIT-Sonden.

| Probe        | $I_0$ (535 nm) | $I$ (535 nm) | $I/I_0$ (535 nm) | $I_0$ (774 nm) | $I$ (774 nm) | $I/I_0$ (773 nm) |
|--------------|----------------|--------------|------------------|----------------|--------------|------------------|
| Jurkat-e-Cy7 | 3.1            | 21           | 6.7              | 7.3            | 10           | 1.4              |
| Jurkat-f-Cy7 | 6.7            | 98           | 15               | 58             | 59           | 1                |
| Jurkat-g-Cy7 | 3.4            | 28           | 8.2              | 46             | 46           | 1                |
| CEM-a-Cy7    | 1.8            | 114          | 63               | 46             | 54           | 1.1              |
| CEM-b-Cy7    | 7.9            | 41           | 5.2              | 40             | 41           | 1                |
| CEM-c-Cy7    | 16             | 76           | 4.7              | 54             | 56           | 1                |

Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5  $\mu$ g. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37 °C. TO:  $\lambda_{ex}$  = 485 nm,  $\lambda_{em}$  = 535 nm, Cy7:  $\lambda_{em}$  = 773 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

## 9.2 Anhang zu Kapitel 4.2

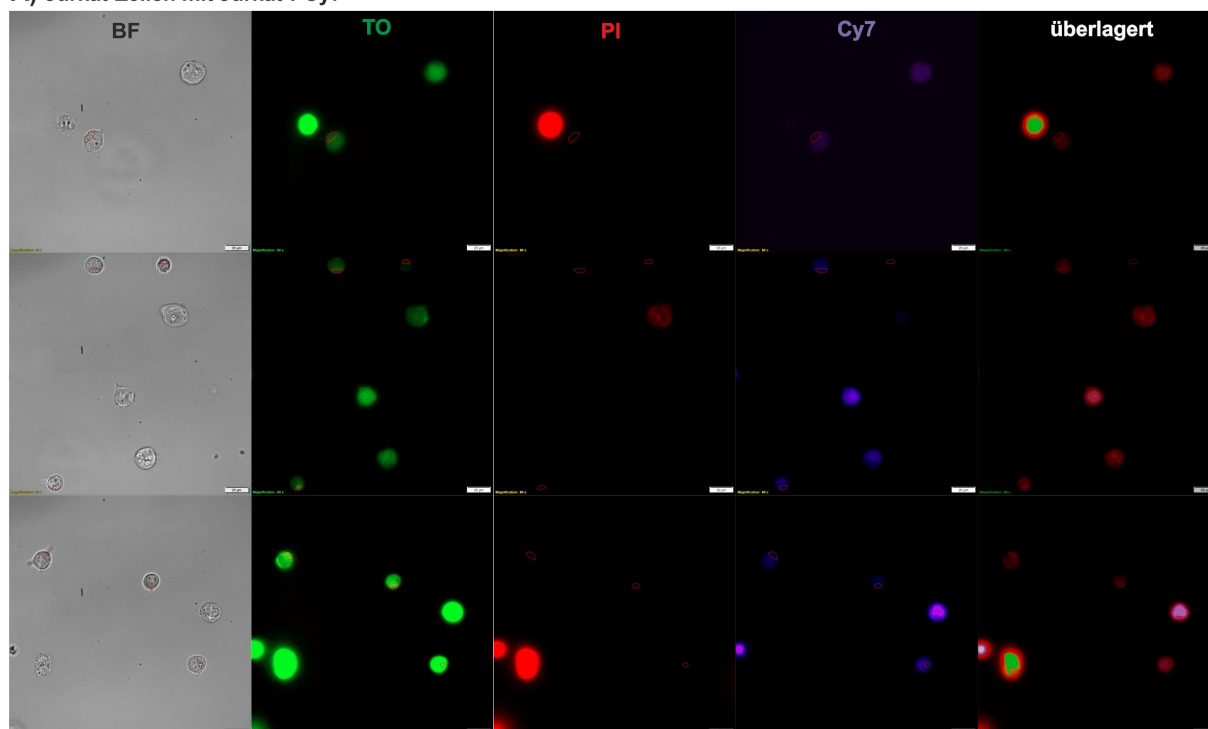
**Tabelle 9.2.9.2** Quantenausbeuten der TO-Cy7-FIT-Sonden.

| Probe        | QY <sub>0</sub><br>(535 nm) | QY<br>(535 nm) | QY/QY <sub>0</sub><br>(535 nm) | QY <sub>0</sub><br>(774 nm) | QY<br>(774 nm) | QY/QY <sub>0</sub><br>(773 nm) |
|--------------|-----------------------------|----------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------|--------------------------------|
| Jurkat-e-Cy7 | 0.01                        | 0.02           | 2.0                            | 0.27                        | 0.29           | 1.1                            |
| Jurkat-f-Cy7 | 0.01                        | 0.18           | 18                             | 0.31                        | 0.30           | 1                              |
| Jurkat-g-Cy7 | 0.02                        | 0.06           | 3.0                            | 0.28                        | 0.32           | 1.1                            |
| CEM-a-Cy7    | 0.01                        | 0.32           | 3.2                            | 0.27                        | 0.31           | 1.1                            |
| CEM-b-Cy7    | 0.02                        | 0.09           | 4.5                            | 0.18                        | 0.20           | 1.1                            |
| CEM-c-Cy7    | 0.05                        | 0.17           | 3.4                            | 0.31                        | 0.30           | 1                              |

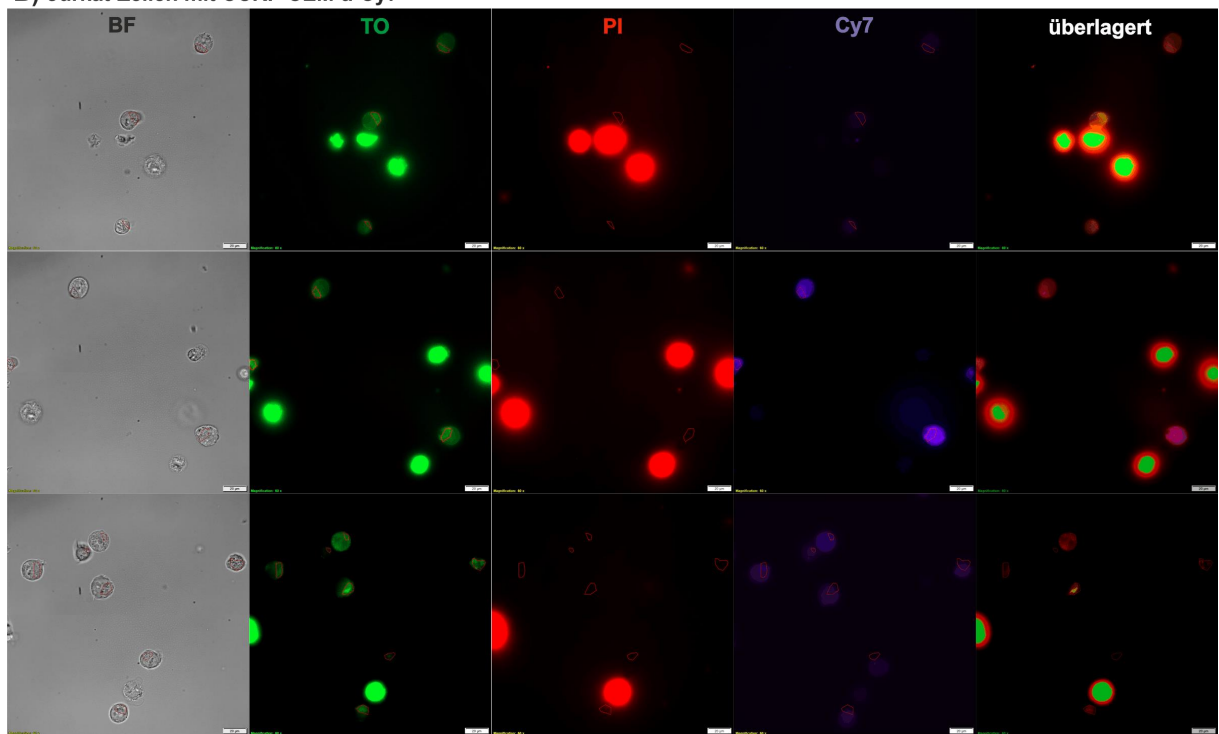
Bedingungen: 0.5  $\mu$ M Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. RNA-Zielsequenz in PBS bei 37 °C. TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 535 nm, Cy7:  $\lambda_{\text{em}}$  = 773 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

### Fluoreszenzbilder der Jurkat- und CCRF-CEM-Zellen analysiert durch ROI an der IX3-Olympus-Software

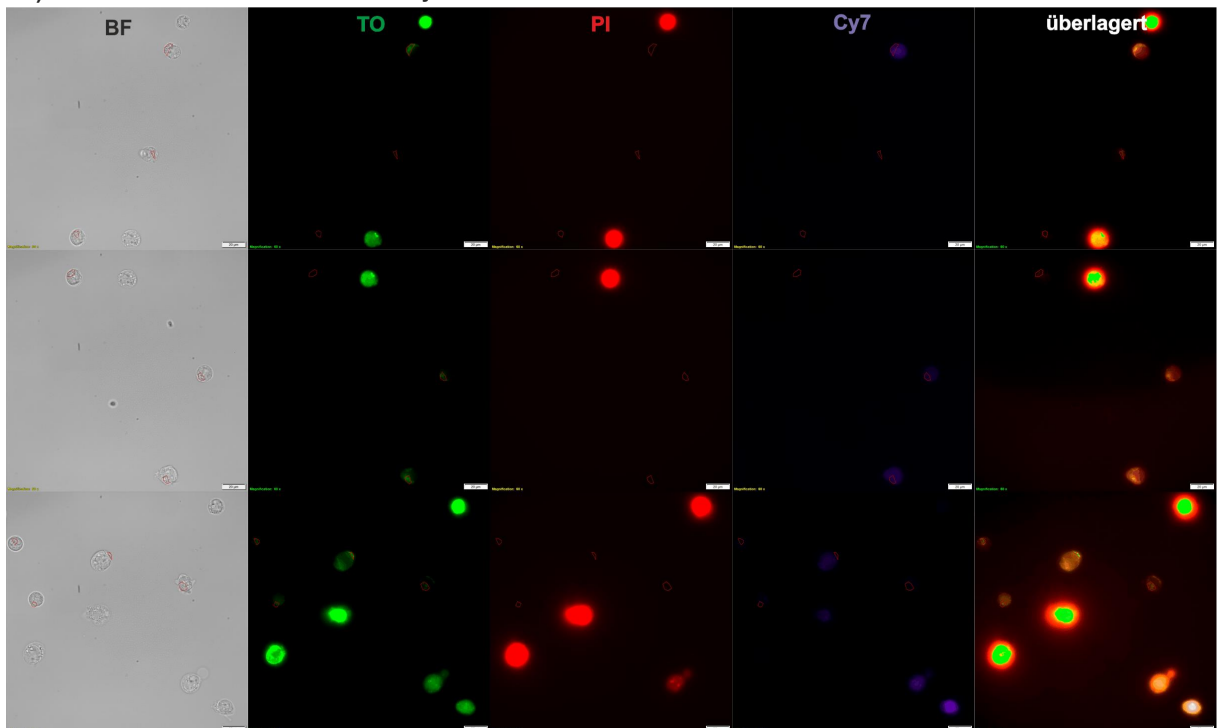
#### A) Jurkat-Zellen mit Jurkat-f-Cy7



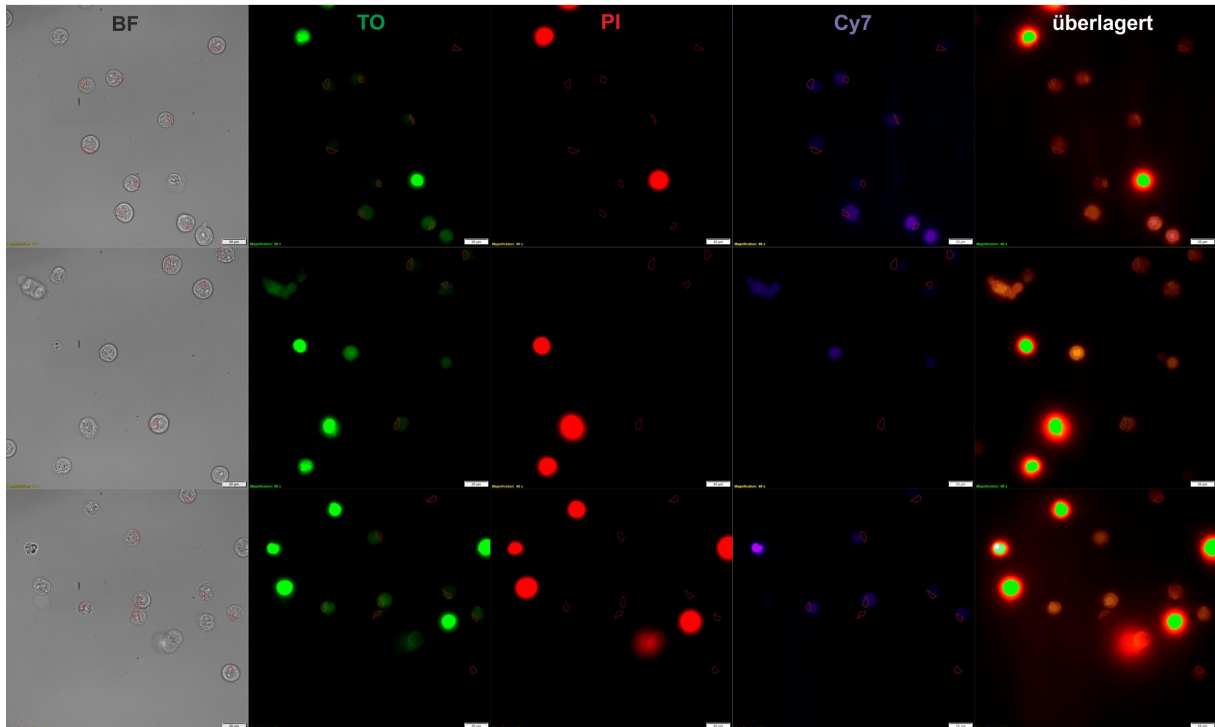
**B) Jurkat-Zellen mit CCRF-CEM-a-Cy7**



**C) CCRF-CEM-Zellen mit CCRF-CEM-a-Cy7**



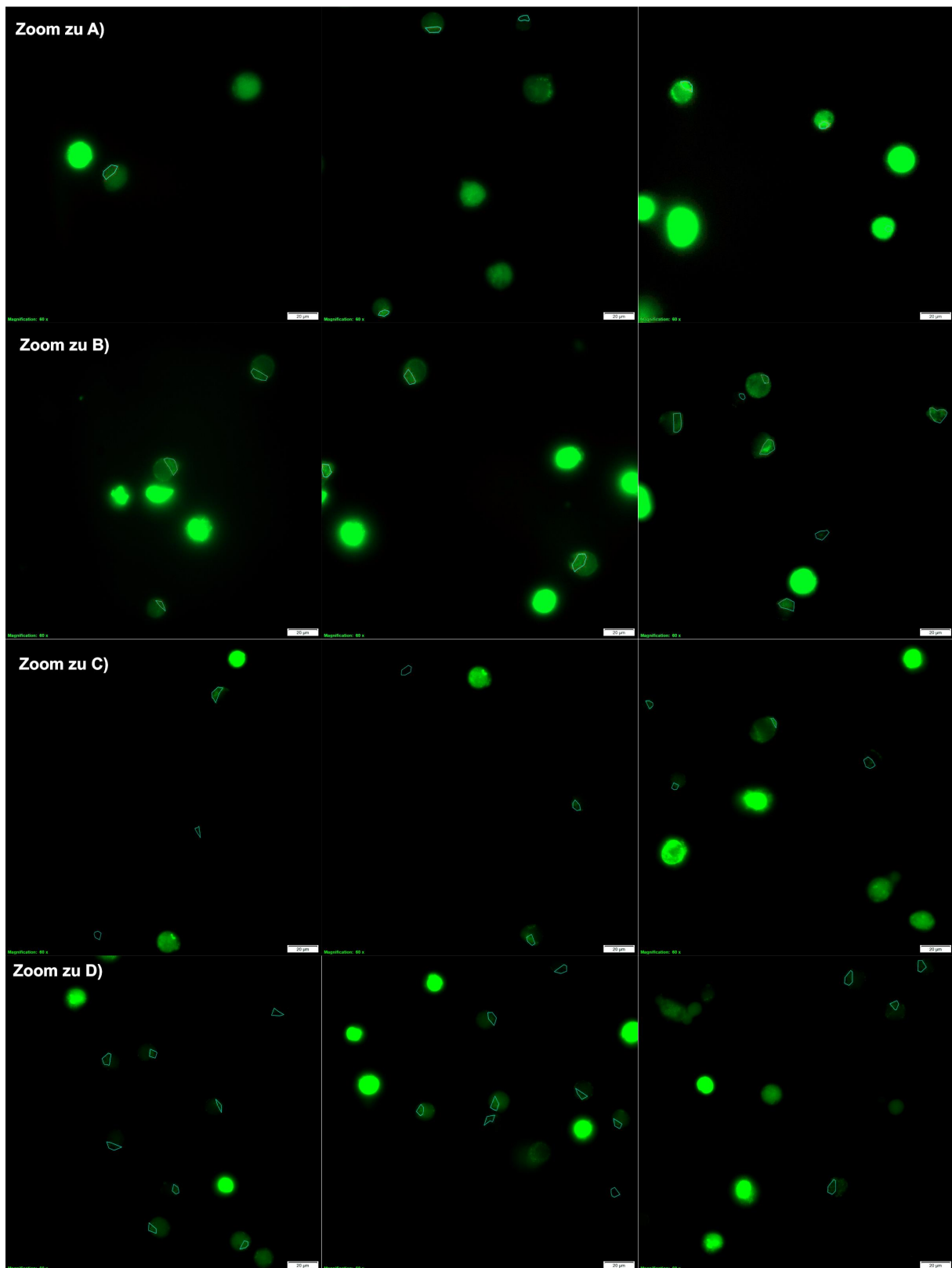
D) CCRF-CEM-Zellen mit Jurkat-f-Cy7



**Abbildung 9.2.9.1** Hellfeld- und Fluoreszenzbilder der Jurkat- und CCRF-CEM-Zellen nach der ROI-Analyse. Es sind jeweils die einzelnen Fluoreszenzkanäle sowie ein überlagertes Bild aller Fluoreszenzkanäle abgebildet. Für eine bessere Darstellungen wurden die Kontraste verändert. Die Analysedaten wurden jedoch aus den Rohdaten bezogen. Grün = TO-FIT-Sonde, rot = Propidiumiodid, violett = Cy7-Sonde. Filter: TO =  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ , PI =  $\lambda_{\text{ex}} = 575/25 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 628/40 \text{ nm}$ , Cy7:  $\lambda_{\text{ex}} = 740/75 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 810/90 \text{ nm}$ , Skala = 20  $\mu\text{m}$ .



### Zoom der Fluoreszenzbilder der Zellen analysiert durch ROI an der IX3-Olympus-Software



**Abbildung 9.2.9.2** Zoom der Fluoreszenzbilder der Zellen nach der ROI-Analyse. Es ist jeweils der TO-Fluoreszenzkanal abgebildet. Für eine bessere Darstellungen wurden die Kontraste verändert. Die Analysedaten wurden jedoch aus den Rohdaten bezogen. Filter: TO =  $\lambda_{\text{ex}} = 500/24 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 545/40 \text{ nm}$ , Skala =  $20 \text{ }\mu\text{m}$ .

### Verwendete Makros bei *ImageJ*

#### Makro 1

```
t=getTitle();  
t=substring(t,0,indexOf(t,"."));  
run("Subtract Background...", "rolling=200 sliding");  
run("Gaussian Blur...", "sigma=1 stack");  
run("Stack to Images");  
selectWindow(t+"-0004");  
run("Add...", "value=1");  
selectWindow(t+"-0002");  
run("Duplicate...", " ");  
rename(t);  
run("Threshold...");
```

Abbildung 9.2.9.3 Textdatei des Makro-1.

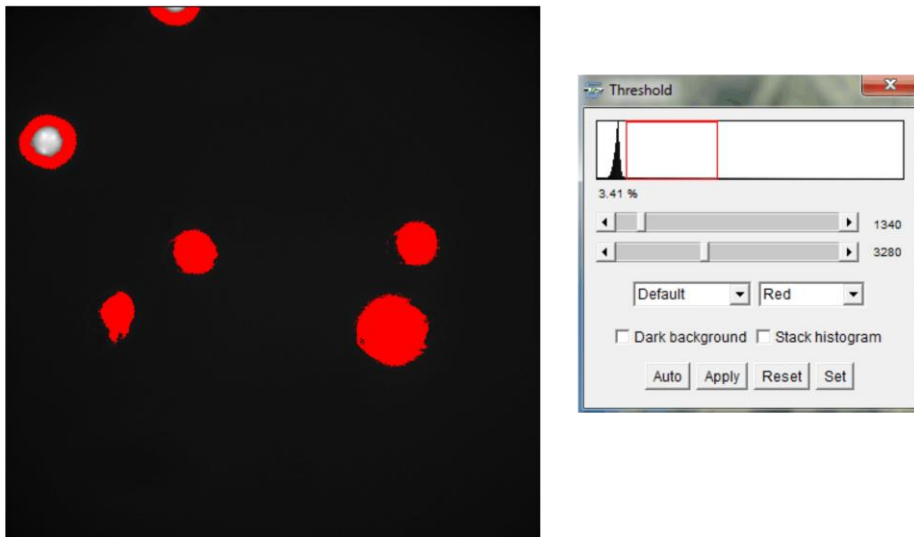


Abbildung 9.2.9.4 Screenshot von *ImageJ* nach Anwendung des Makro-1 und Festlegen des *threshhold*.

---

**Makro 2**

```
t=getTitle();
run("Create Selection");
selectWindow(t+"-0002");
run("Restore Selection");
run("Clear Outside");
run("Select None");
selectWindow(t);
close();

imageCalculator("Divide create 32-bit", t+"-0002",t+"-0004");
selectWindow(t+"-0002");
run("Add Slice");
run("Add Slice");
run("32-bit");
run("Stack to Hyperstack...", "order=xyczyt(default) channels=3 slices=1 frames=1 display=Color");
Stack.setChannel(1);
run("Yellow");
selectWindow(t+"-0004");
run("Select All");
run("Copy");
selectWindow(t+"-0002");
Stack.setChannel(2);
run("Paste");
run("Grays");
selectWindow("Result of "+t+"-0002");
run("Select All");
run("Copy");
selectWindow(t+"-0002");
Stack.setChannel(3);
run("Paste");
run("Red Hot");
```

```
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
```

Abbildung 9.2.9.5 Textdatei des Makro-2.

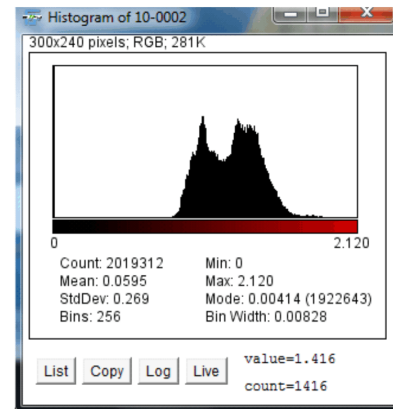
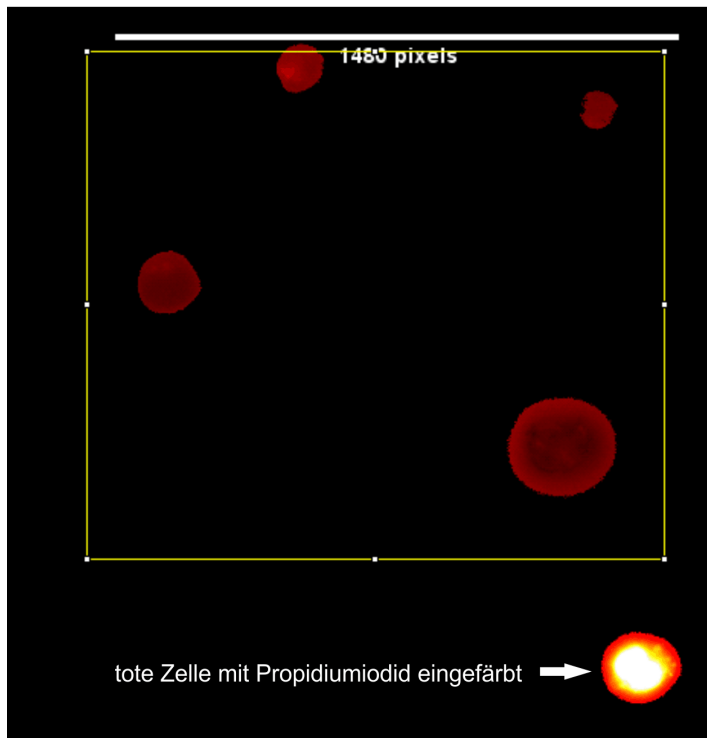
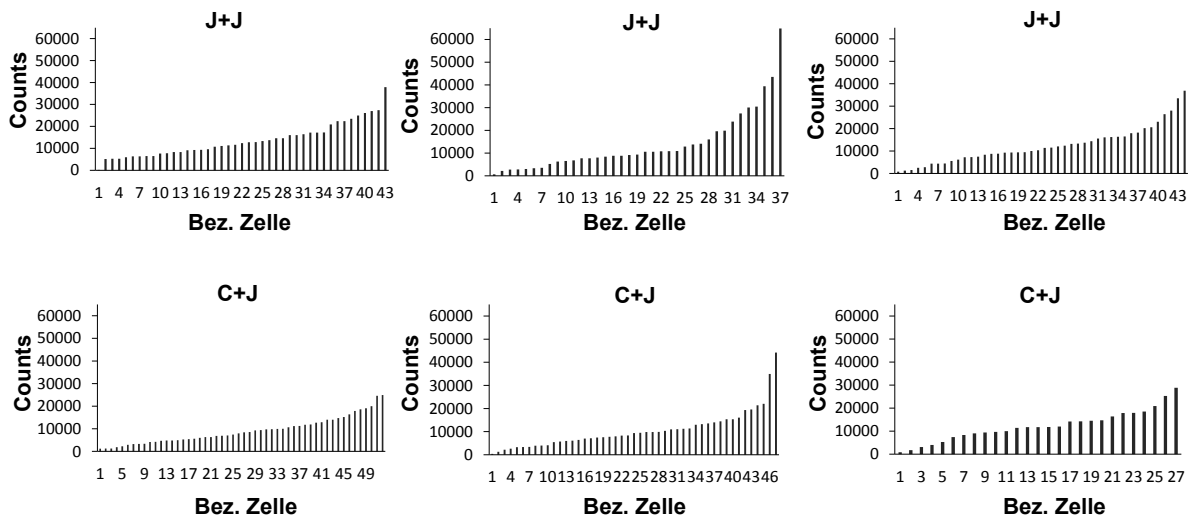


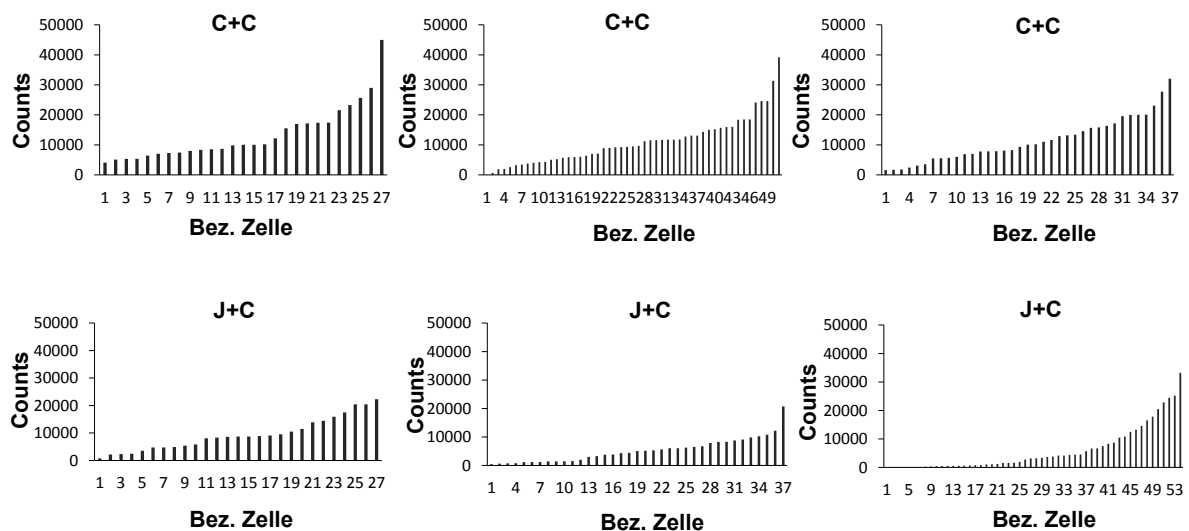
Abbildung 9.2.9.6 Screenshot nach Anwendung des Makro-2 mit dem dazugehörigem Histogramm.

## Ergebnisse der finalen Auswertemethode

A)



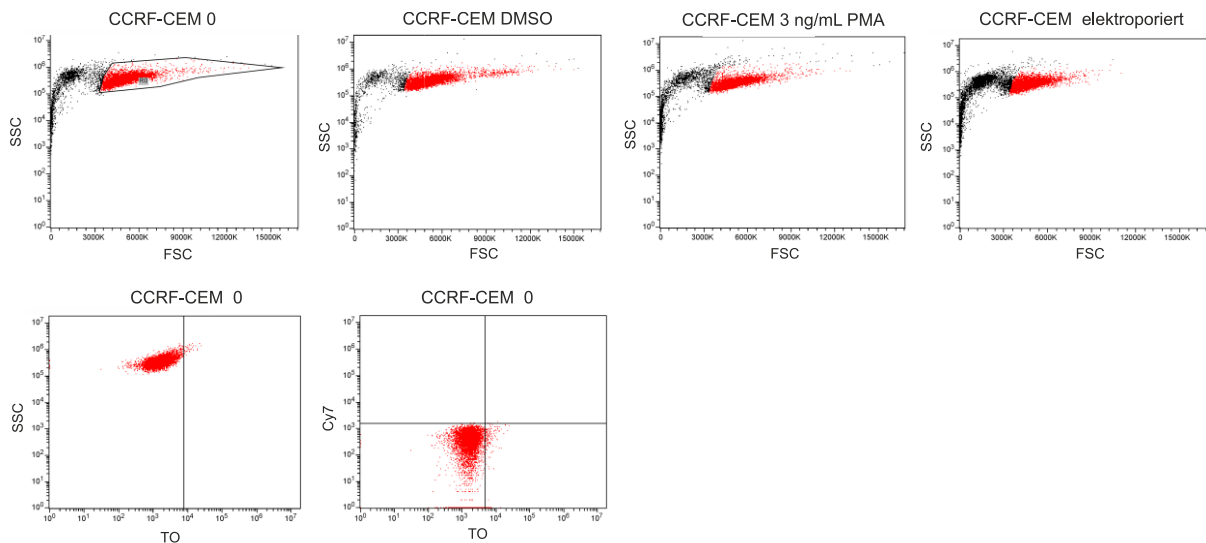
B)



**Abbildung 9.2.9.7** *Counts* (Summe der Pixel) der einzelnen A) Jurkat-Zellen und B) CCRF-CEM-Zellen aus drei unabhängigen Messungen. Die Bilder wurden zuvor über *ImageJ* bearbeitet (Hintergrund abgezogen und der erste Ratiocount auf das niedrigste mögliche TO/Cy7-Verhältnis gesetzt) und anschließend die *Counts* addiert und in einem Balkendiagramm die Summe der *Counts* für jede Zelle einzeln angegeben. Der erste Buchstabe steht für die Zelllinie J= Jurkat und C = CCRF-CEM und der zweite für die Sonde J= Jurkat-f-Cy7 und C= CCRF-CEM-a-Cy7.

## 9.2.10 Anhang zu Kapitel 4.2.10

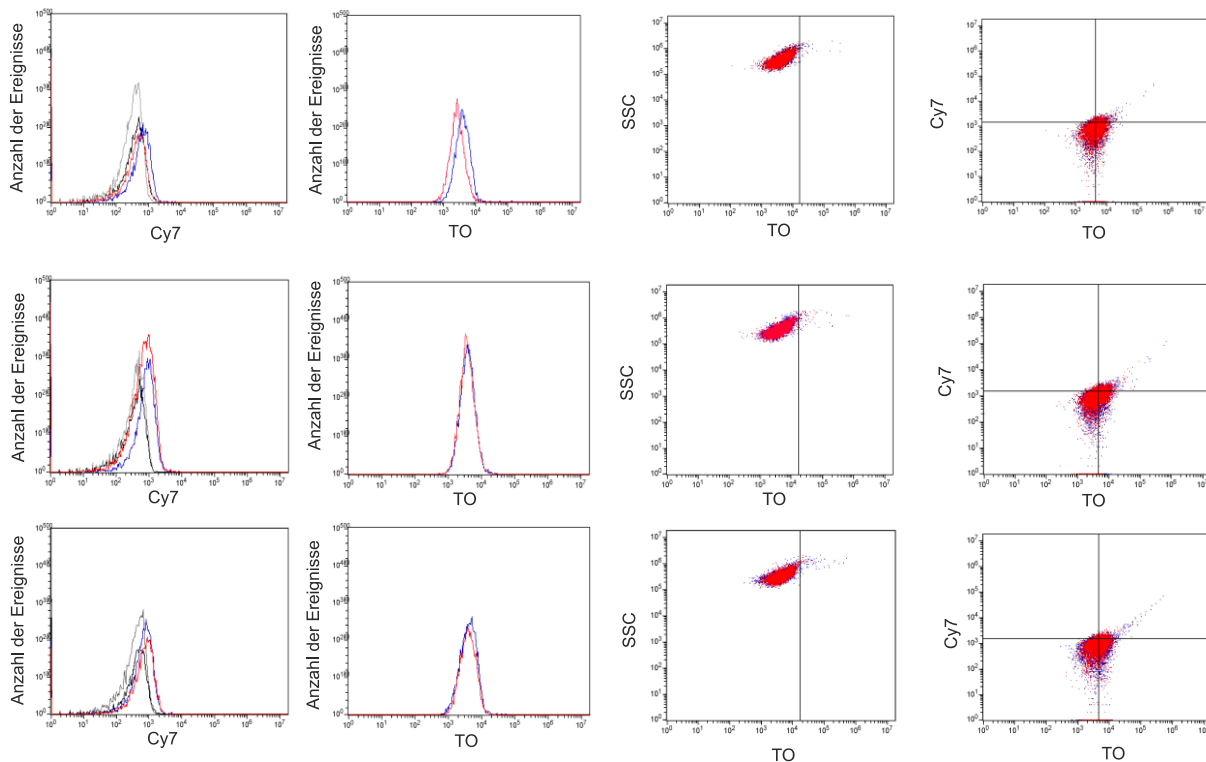
## Daten der Durchflusszytometrie



**Abbildung 9.2.10.1** Auftragungen SSC gegen FCS der Durchflusszytometermessungen von jeweils 10 000 CCRF-CEM-Zellen ohne Behandlung, mit der Zugabe von DMSO, mit der Zugabe von 3 ng/ml PMA und nach Elektroporation. Gezeigt ist das *gaten* und die daraus folgende Population (rot markiert). Die Auftragung von SSC gegen TO und Cy7 gegen TO zeigt die Fluoreszenz der Zellen, die als Hintergrundfluoreszenz angenommen wird und die Position der Quadranten bestimmt. Durchgeführt wurden die Messungen an einem *BD Accuri™ C6*.

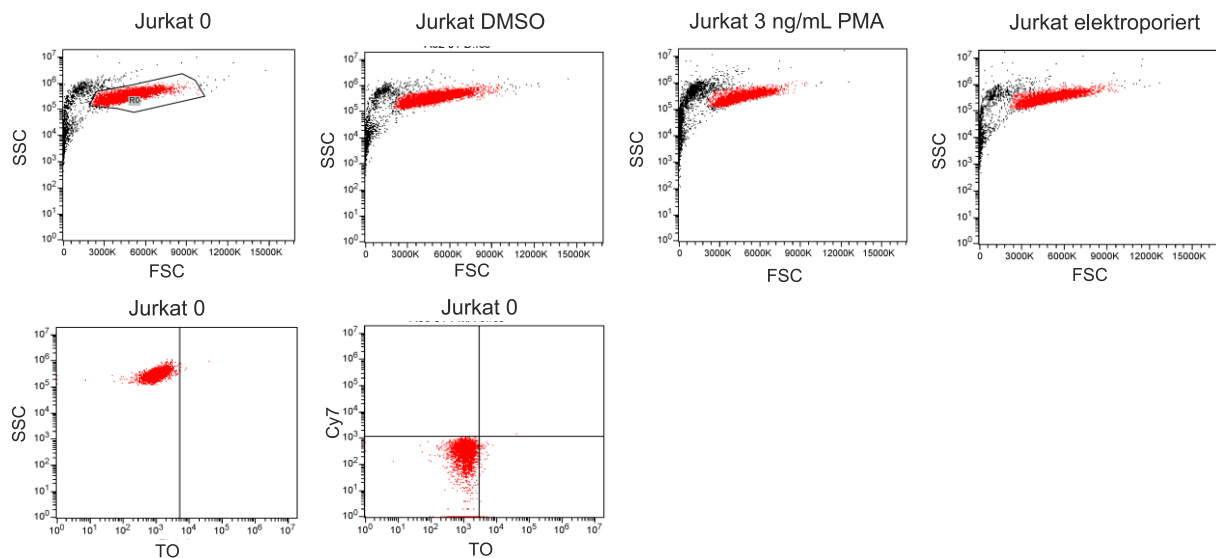
## CCRF-CEM Zellen

unbehandelt

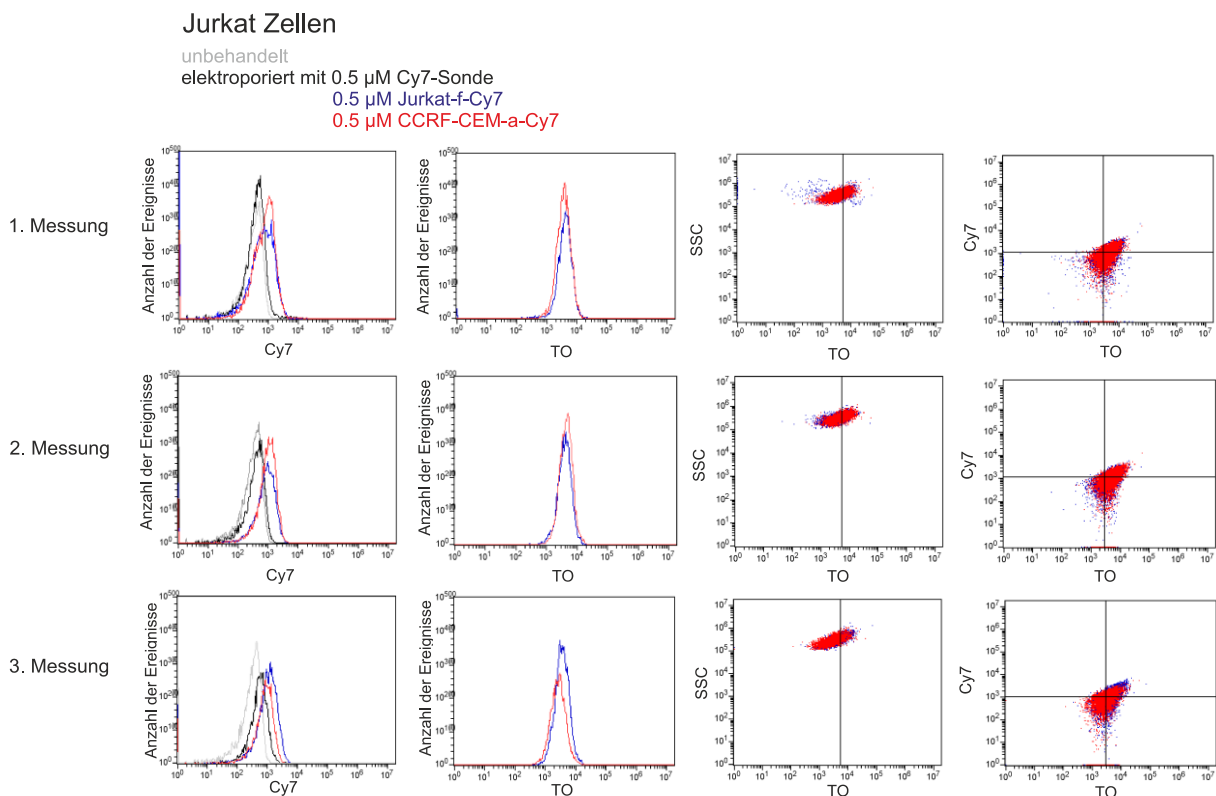
elektroporiert mit 0,5  $\mu$ M Cy7-Sonde0,5  $\mu$ M CCRF-CEM-a-Cy70,5  $\mu$ M Jurkat-f-Cy7

**Abbildung 9.2.10.2** Auftragungen der Durchflusszytometermessungen von jeweils 10 000 CCRF-CEM-Zellen mit 0,5  $\mu$ M der jeweiligen TO-Cy7-Sonde durchgeführt an einem *BD Accuri™ C6*. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt und ausgewertet.

## 9.2 Anhang zu Kapitel 4.2



**Abbildung 9.2.10.3** Auftragungen SSC gegen FCS der Durchflusszytometermessungen von jeweils 10 000 Jurkat-Zellen ohne Behandlung, mit der Zugabe von DMSO, mit der Zugabe von 3 ng/ml PMA und nach Elektroporation. Gezeigt ist das *gate* und die daraus folgende Population (rot markiert). Die Auftragung von SSC gegen TO und Cy7 gegen TO zeigt die Fluoreszenz der Zellen, die als Hintergrundfluoreszenz angenommen wird und die Position der Quadranten bestimmt. Durchgeführt wurden die Messungen an einem *BD Accuri™ C6*.



**Abbildung 9.2.10.4** Auftragungen der Durchflusszytometermessungen von jeweils 10 000 Jurkat- Zellen mit 0.5  $\mu$ M der jeweiligen TO-Cy7-Sonde durchgeführt an einem *BD Accuri™ C6*. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt und ausgewertet.

## 9.3 Anhang zu Kapitel 4.3

### 9.3.1 Anhang zu Kapitel 4.3.1

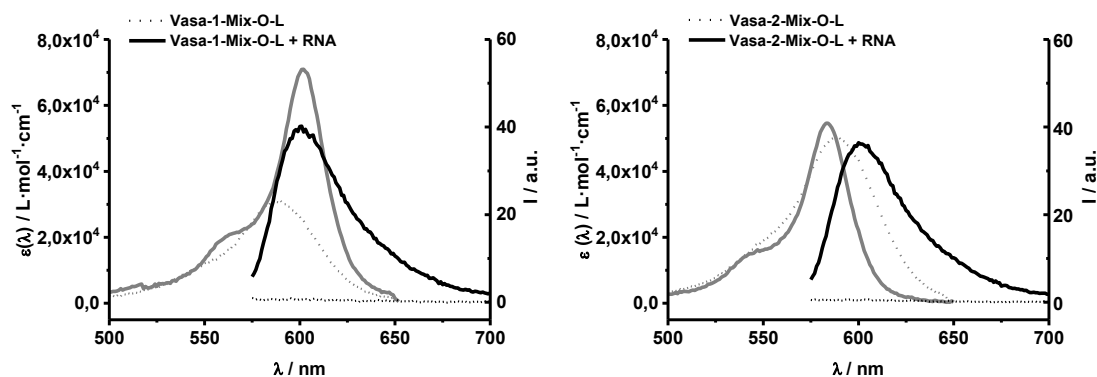
#### Fluoreszenzeigenschaften der Vasa-CB-Sonden

Tabelle 9.3.1.1 Fluoreszenzdaten der Vasa-FIT-Sonden.

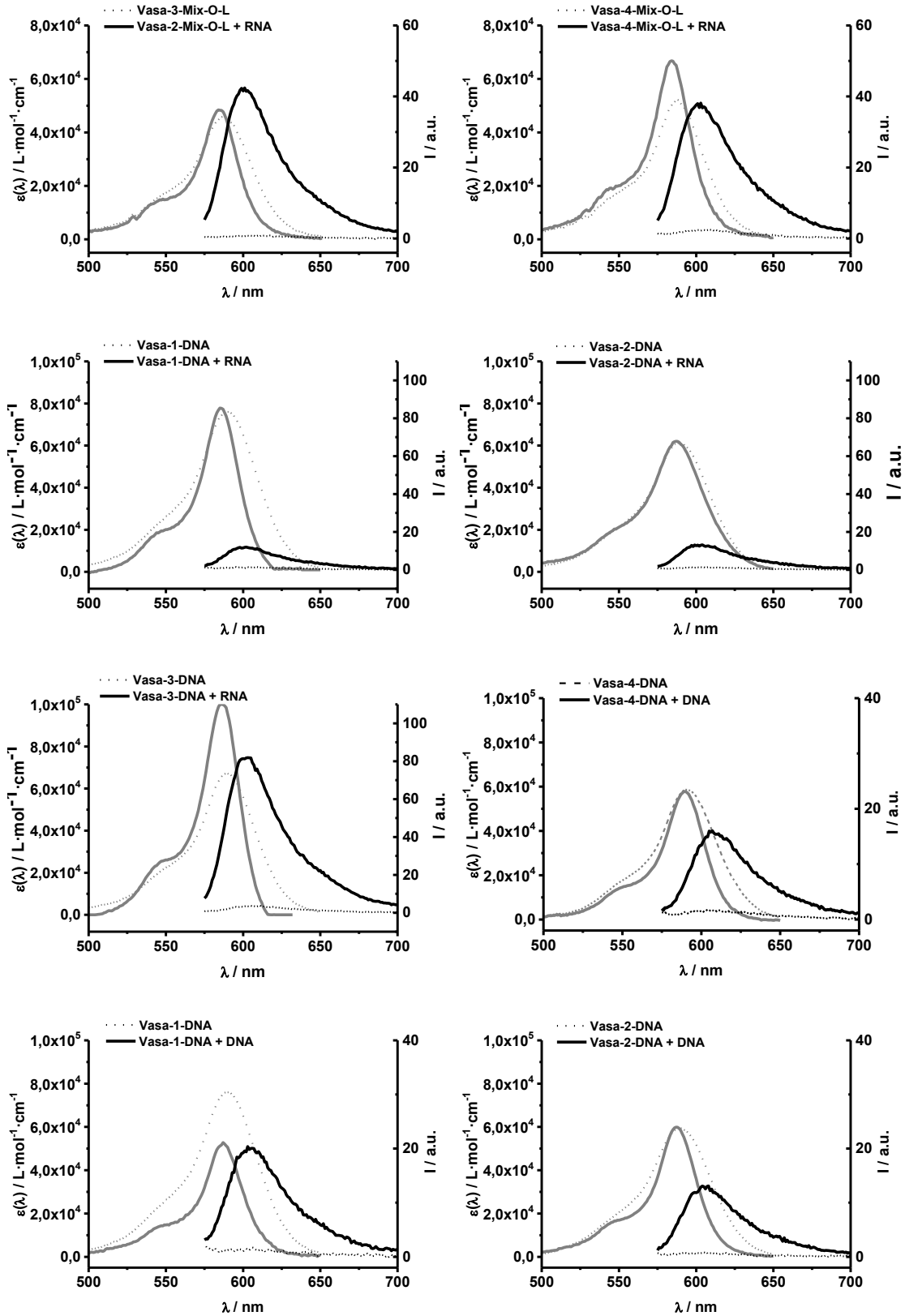
| Sonde            | Sequenz (X = Ser(CB))                | $I_0$ | $I$ | $I/I_0$ | $\Phi_0$ | $\Phi$ | $\Phi/\Phi_0$ |
|------------------|--------------------------------------|-------|-----|---------|----------|--------|---------------|
| Vasa-1-Mix       | <u>UCUAUUUUUCXT</u> <u>CAUUUUUCA</u> | 0.8   | 154 | 195     | 0.004    | 0.45   | 112           |
| Vasa-1-Mix-O-L   | <u>UCUAUUUUUCXTCAUUUUUCA</u>         | 0.5   | 35  | 65      | 0.007    | 0.18   | 25            |
| Vasa-1-DNA       | TCTATTTTCXTCATTTTCA                  | 1.0   | 11  | 11      | 0.01     | 0.09   | 6             |
| Vasa-1-DNA + DNA | TCTATTTTCXTCATTTTCA                  | 1.0   | 10  | 10      | 0.003    | 0.09   | 10            |
| Vasa-2-Mix       | <u>UCCAUUUUUCXT</u> <u>TAUUUUUCU</u> | 2.0   | 151 | 69      | 0.009    | 0.47   | 52            |
| Vasa-2-Mix-O-L   | <u>UCCAUUUUUCXTTAUUUUUCU</u>         | 0.5   | 32  | 52      | 0.004    | 0.31   | 77            |
| Vasa-2-DNA       | TCCATTTTCXTTATTTTCT                  | 1.1   | 12  | 11      | 0.004    | 0.04   | 14            |
| Vasa-2-DNA + DNA | TCCATTTTCXTTATTTTCT                  | 1.1   | 12  | 11      | 0.002    | 0.04   | 20            |
| Vasa-3-Mix       | <u>GGCCGCCGUTXT</u> <u>TCCUG</u>     | 1.1   | 158 | 125     | 0.007    | 0.47   | 67            |
| Vasa-3-Mix-O-L   | <u>GGCCGCCGUTXTTCCUG</u>             | 0.8   | 36  | 42      | 0.006    | 0.27   | 45            |
| Vasa-3-DNA       | GGCCGCCGTTXTCCTG                     | 2.7   | 82  | 30      | 0.01     | 0.21   | 34            |
| Vasa-3-DNA + DNA | GGCCGCCGTTXTCCTG                     | 2.7   | 18  | 6.6     | 0.004    | 0.06   | 7             |
| Vasa-4-Mix       | <u>GGAACUACXT</u> <u>GUUGGGC</u>     | 2.0   | 164 | 68      | 0.010    | 0.45   | 37            |
| Vasa-4-Mix-O-L   | <u>GGAACUACXTGUUGGGC</u>             | 2.4   | 34  | 14      | 0.020    | 0.24   | 12            |
| Vasa-4-DNA       | GGAACUACXTGTTGGGC                    | 1.9   | 8   | 5       | 0.009    | 0.06   | 4             |
| Vasa-4-DNA + DNA | GGAACUACXTGTTGGGC                    | 1.9   | 8   | 5       | 0.007    | 0.06   | 9             |

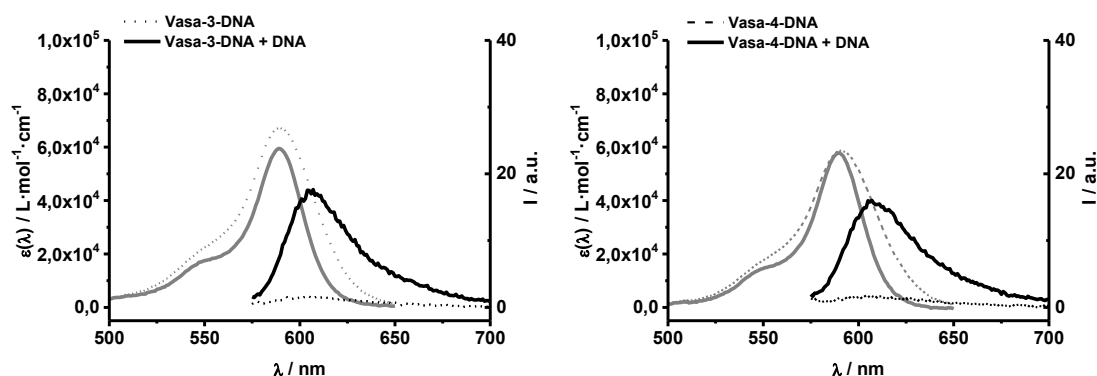
Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. RNA- oder DNA-Zielsequenz in PBS bei 37 °C. CB:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 560 nm und  $\lambda_{\text{em}}$  = 605 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

#### Emissions- und Absorptionsspektren der Vasa-CB-Sonden zu Kapitel 4.3.1









**Abbildung 9.3.1.1** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der Vasa-FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA- oder DNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37  $^\circ\text{C}$  in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); CB:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 560 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 575 - 700 nm,  $\text{slit}_{\text{ex}}$  = 5 nm,  $\text{slit}_{\text{em}}$  = 5 nm.

### 9.3.2 Anhang zu Kapitel 4.3.2

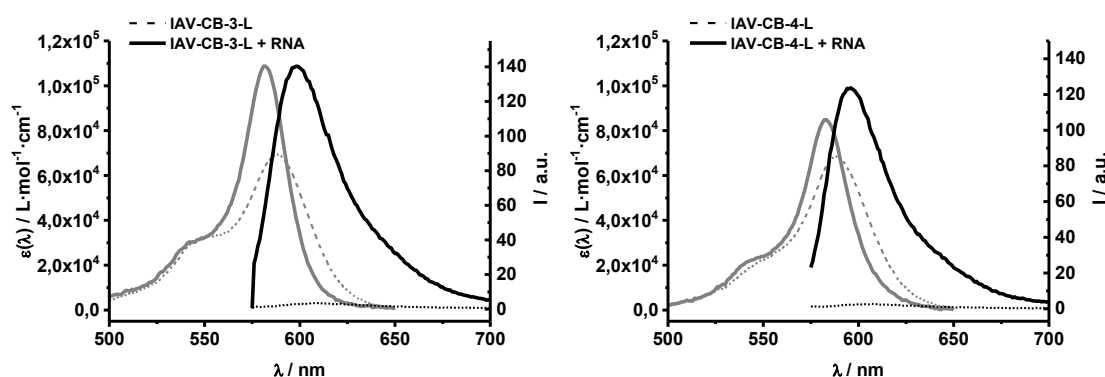
#### Fluoreszenzeigenschaften der Influenza IAV-CB-Sonden

**Tabelle 9.3.2.1** Fluoreszenzdaten der IAV-FIT-Sonden.

| Sonde      | $I_0$ | $I$ | $I/I_0$ | $\epsilon$ (560 nm) | $\Phi_0$ | $\Phi$ | $\Phi/\Phi_0$ | Br (560 nm) |
|------------|-------|-----|---------|---------------------|----------|--------|---------------|-------------|
| IAV-QB-3-L | 3.4   | 127 | 37      | 40823               | 0.01     | 0.43   | 43            | 17          |
| IAV-QB-4-L | 2.5   | 106 | 43      | 30419               | 0.01     | 0.53   | 53            | 16          |

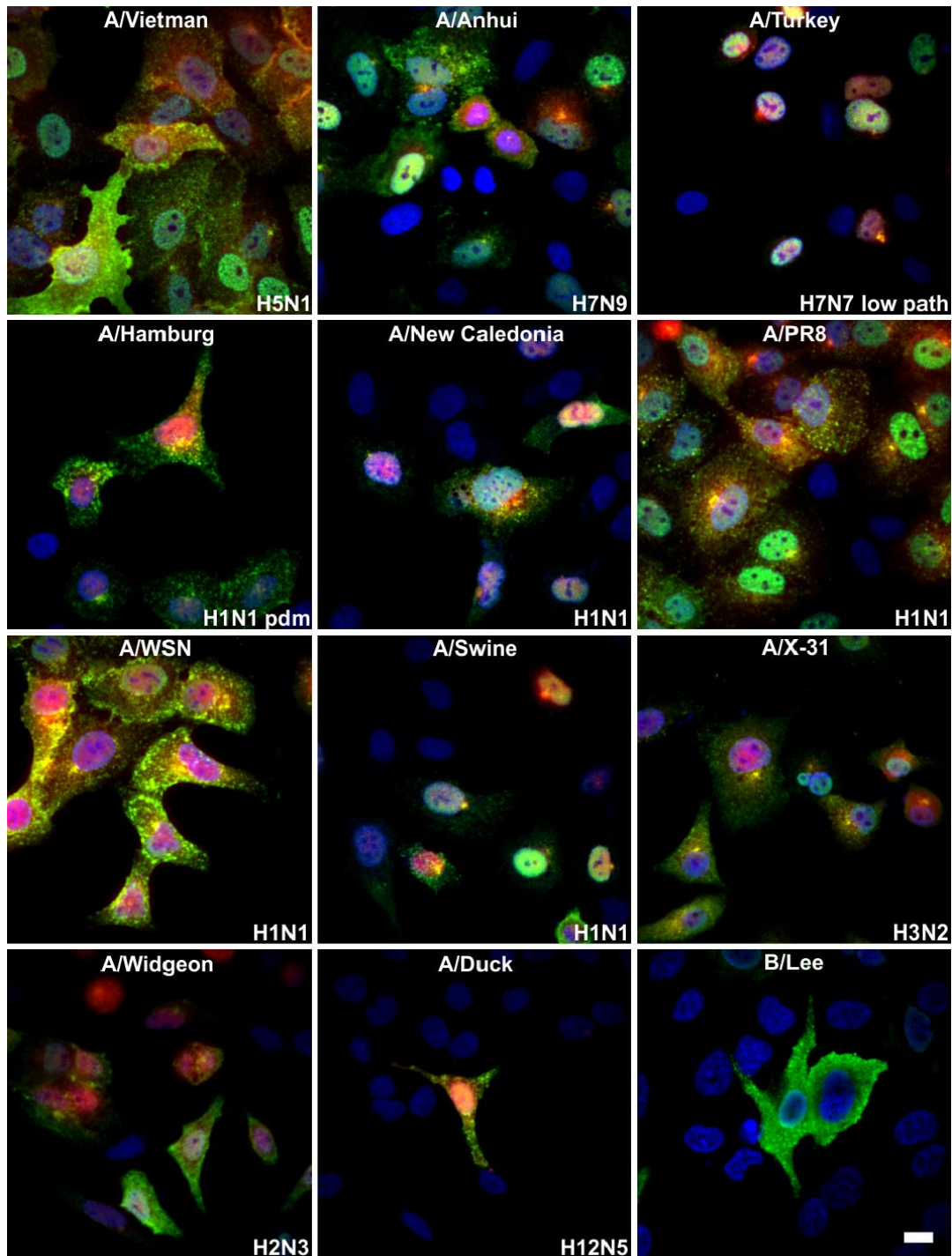
Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. RNA- Zielsequenz in PBS bei 37  $^\circ\text{C}$ . CB:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 560 nm und  $\lambda_{\text{em}}$  = 605 nm,  $\text{slit}_{\text{ex}}$  = 5 nm,  $\text{slit}_{\text{em}}$  = 5 nm.

#### Absorptions- und Emissionsspektren der IAV-CB-Sonden



**Abbildung 9.3.2.1** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der IAV-FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA- oder DNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. RNA- Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37  $^\circ\text{C}$  in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); CB:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 560 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 575 - 700 nm,  $\text{slit}_{\text{ex}}$  = 5 nm,  $\text{slit}_{\text{em}}$  = 5 nm.

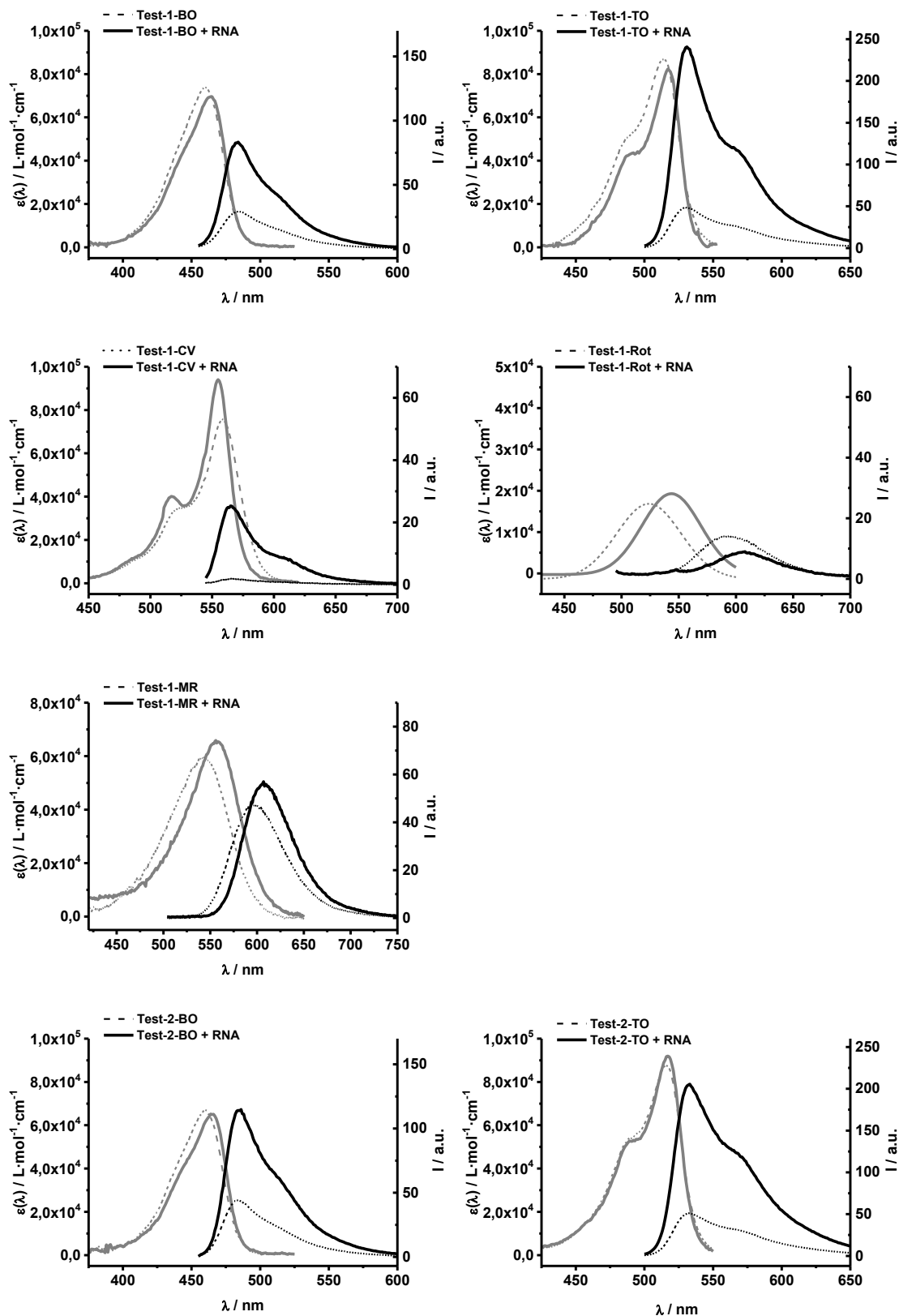
## Fluoreszenzbilder der A549-Zellen



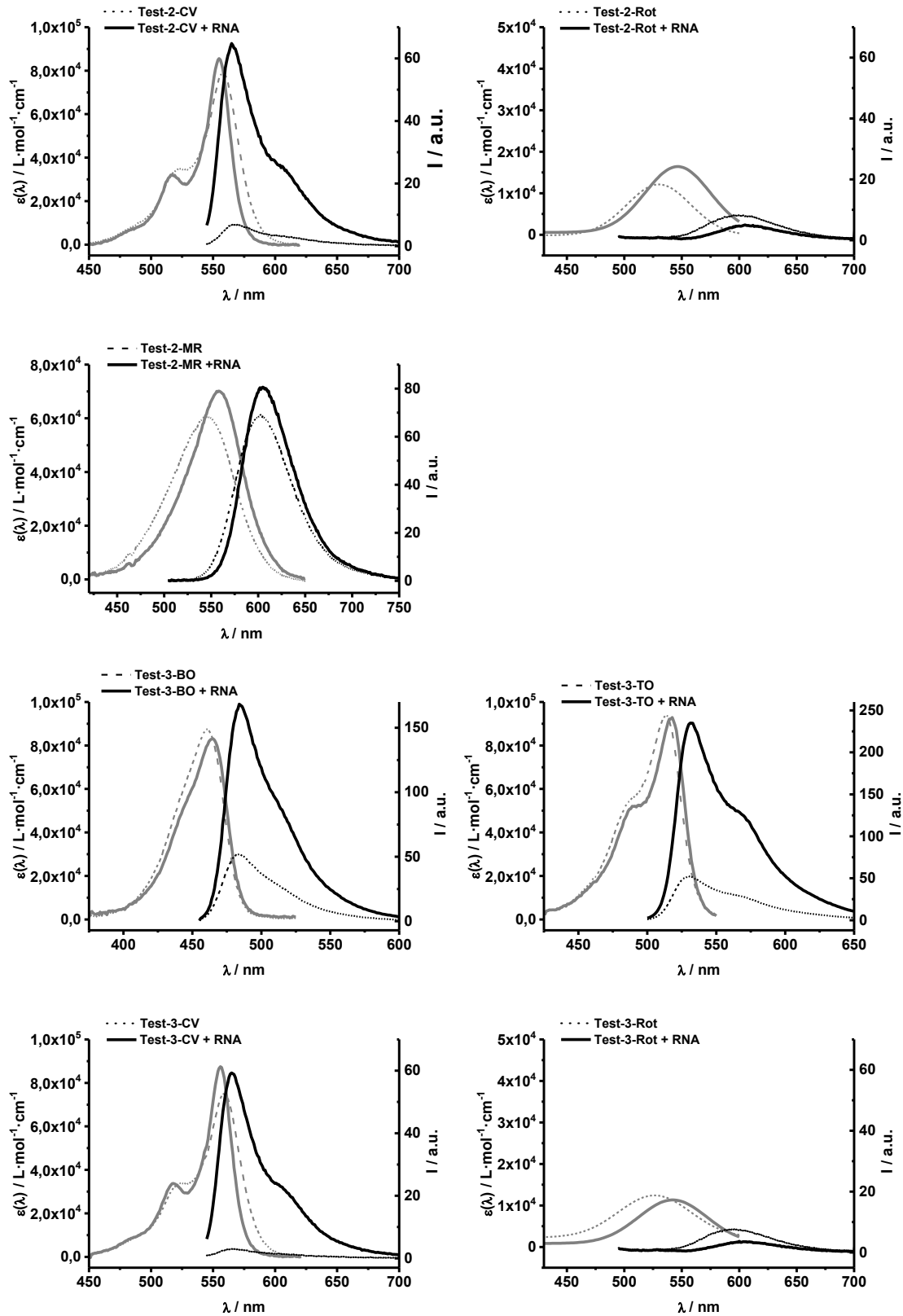
**Abbildung 9.3.2.2** IAV-CB-4-L in A549-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen IA-Viren für 10 h und mit Influenza B/Lee/40 für 12 h. Die Zellen wurden fixiert, durch FISH mit der **IAV-CB-4-L** (rot),  $\alpha$ -NP (grün) und DAPI (blau) angefärbt. Das CB-Signal konnte in den mit IAV infizierten Zellen, nicht jedoch in der mit Influenza B/Lee/40 infizierten Zelle beobachtet werden. Die Fluoreszenzkanäle sind überlagert dargestellt. Skala = 10  $\mu$ m.

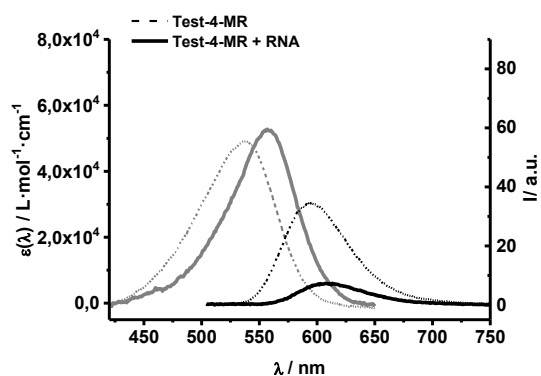
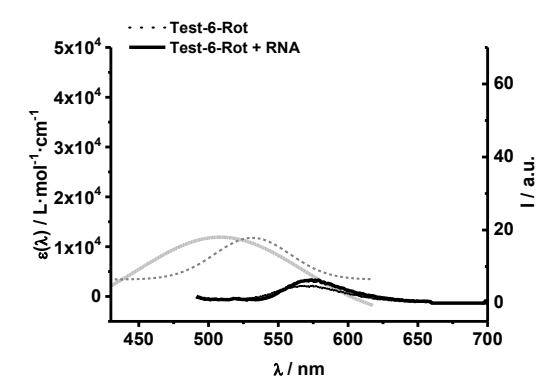
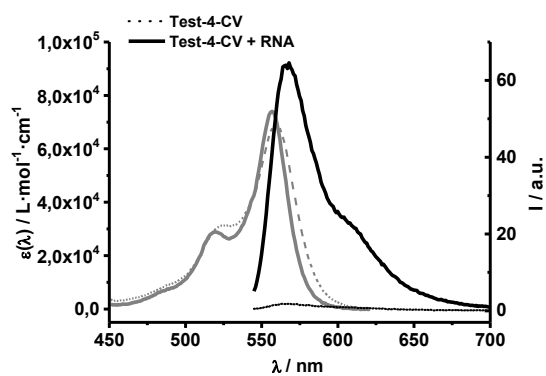
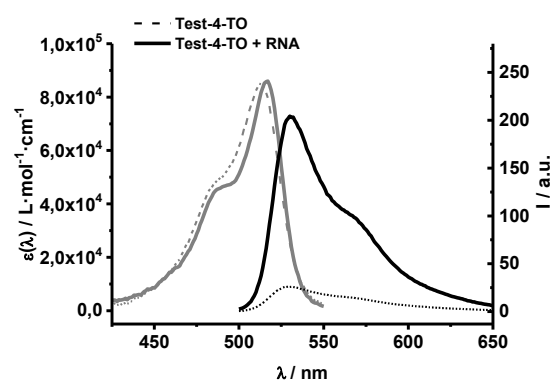
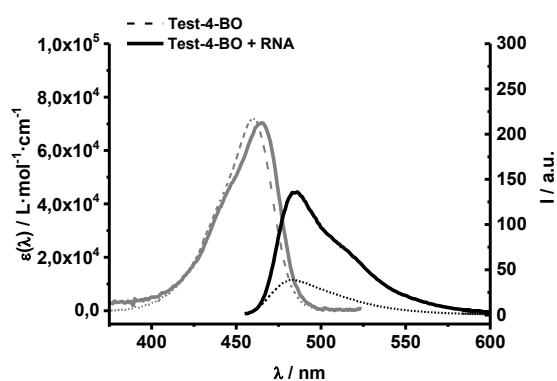
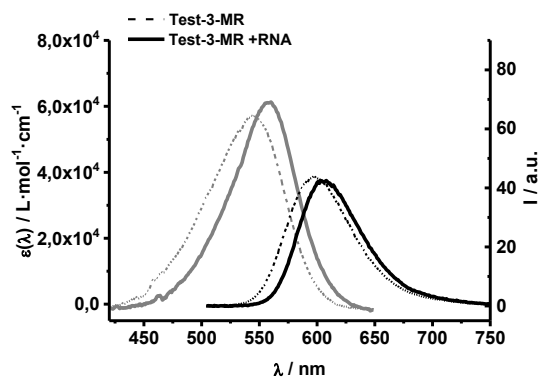
## 9.3.3 Anhang zu Kapitel 4.3.3

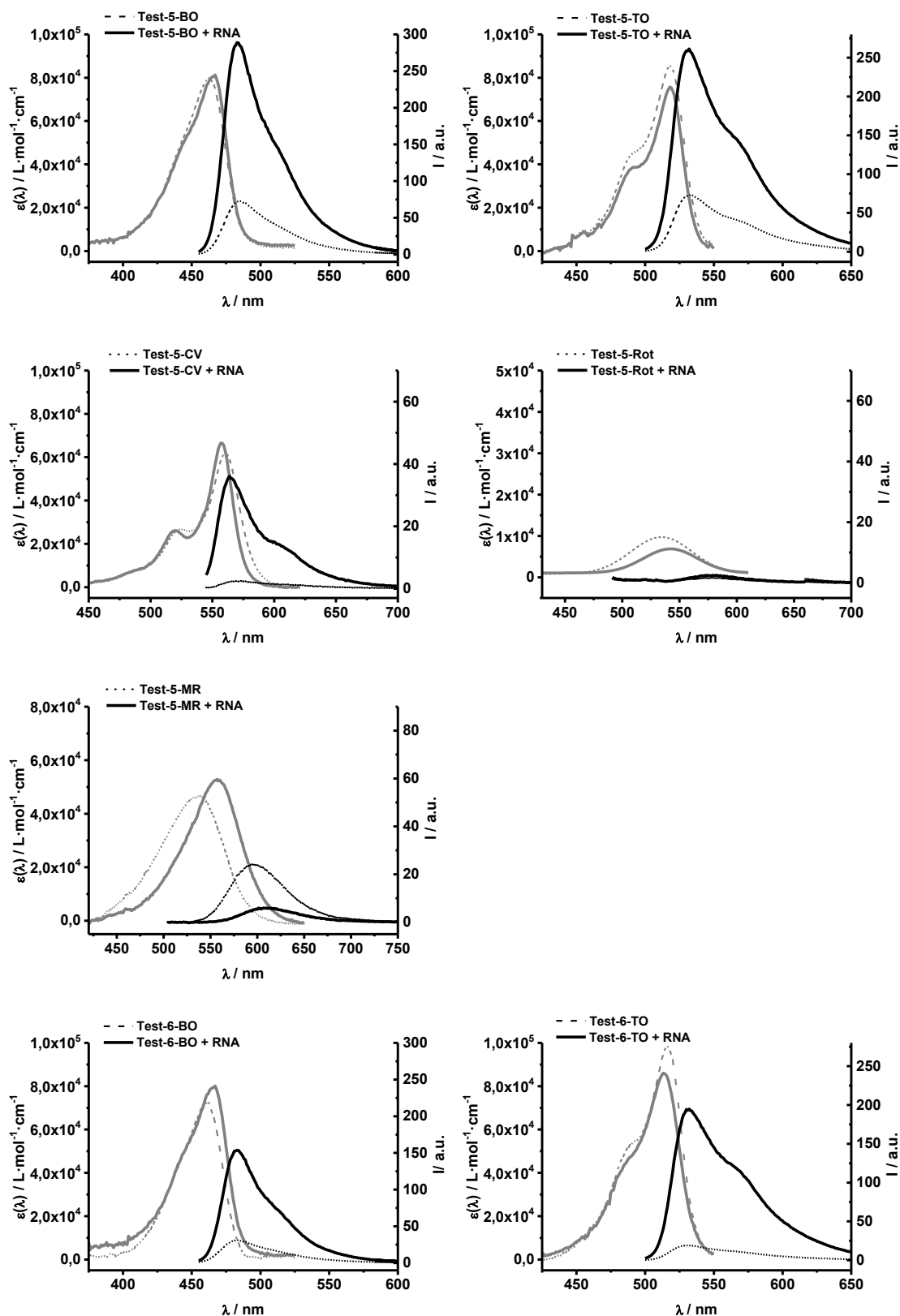
## Absorptions- und Emissionsspektren der Test-Sonden

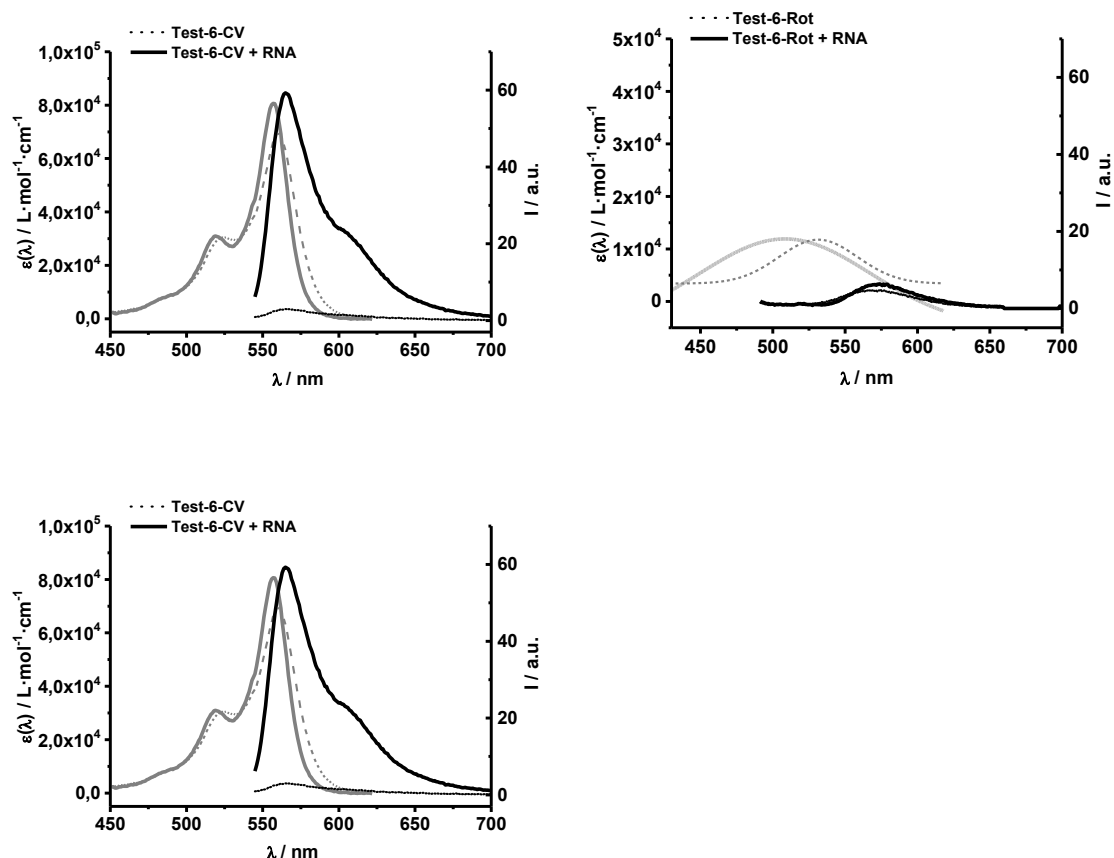


### 9.3 Anhang zu Kapitel 4.3



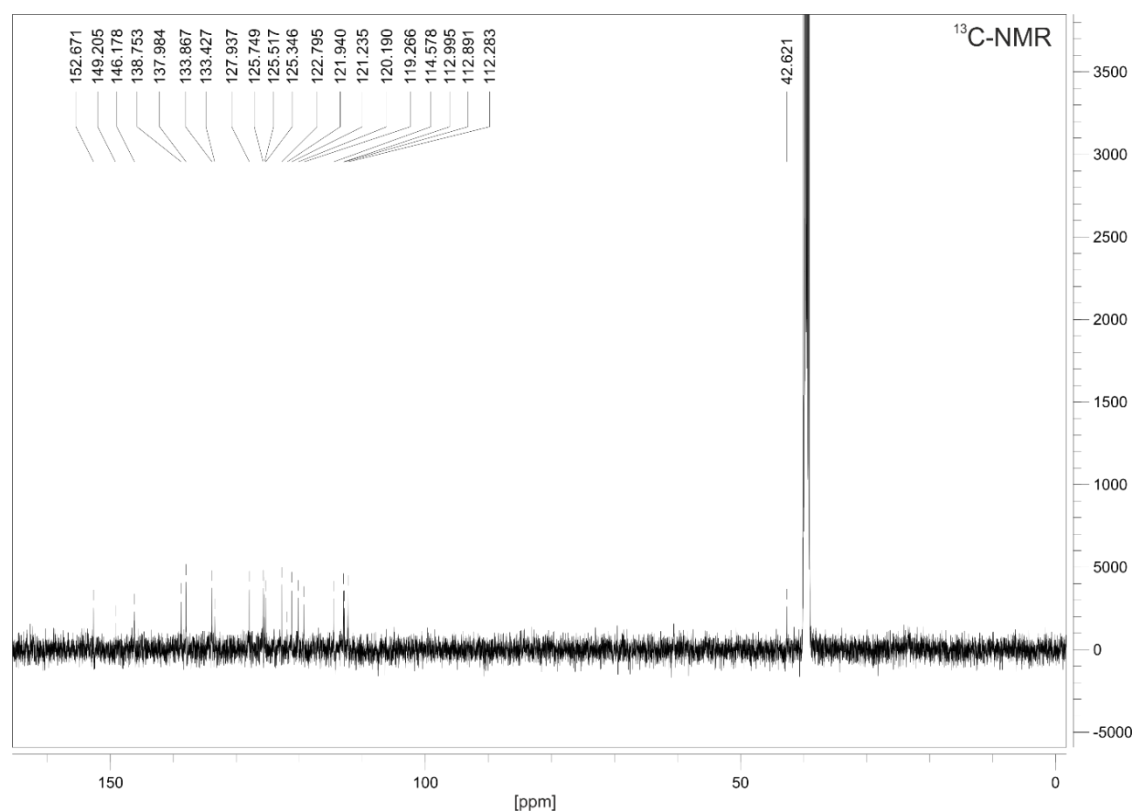
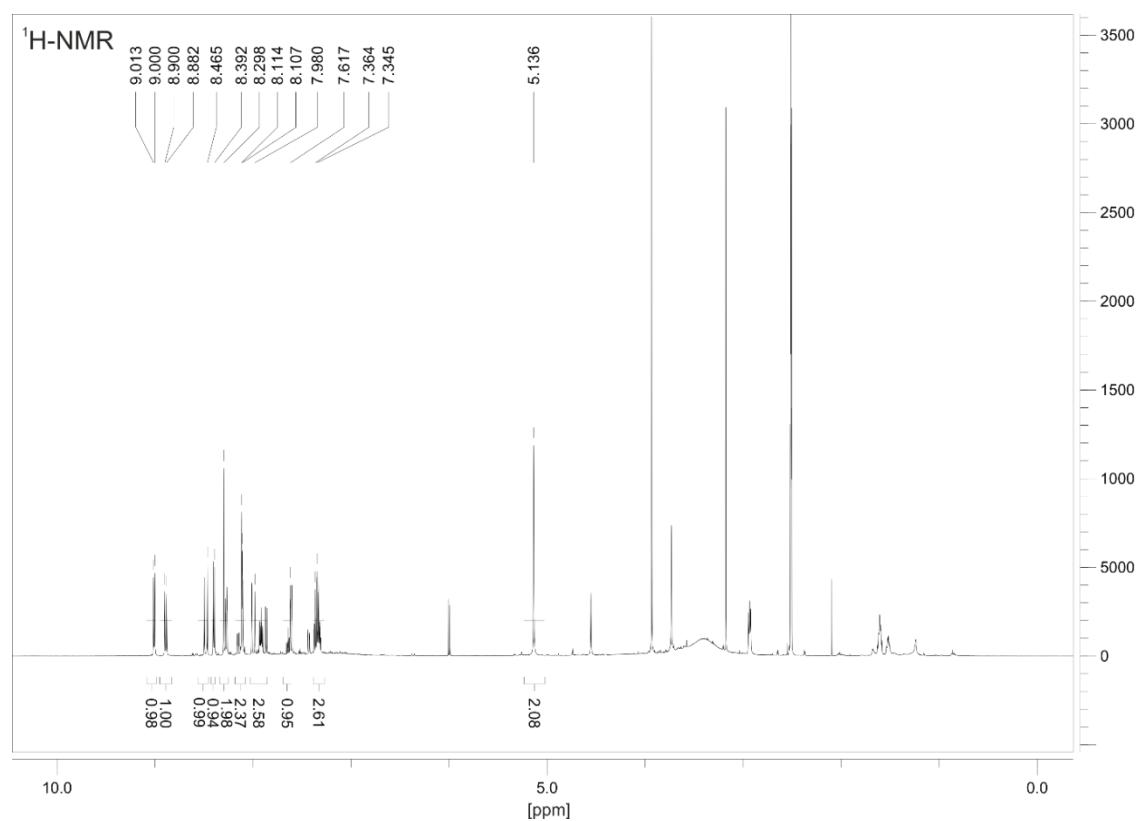


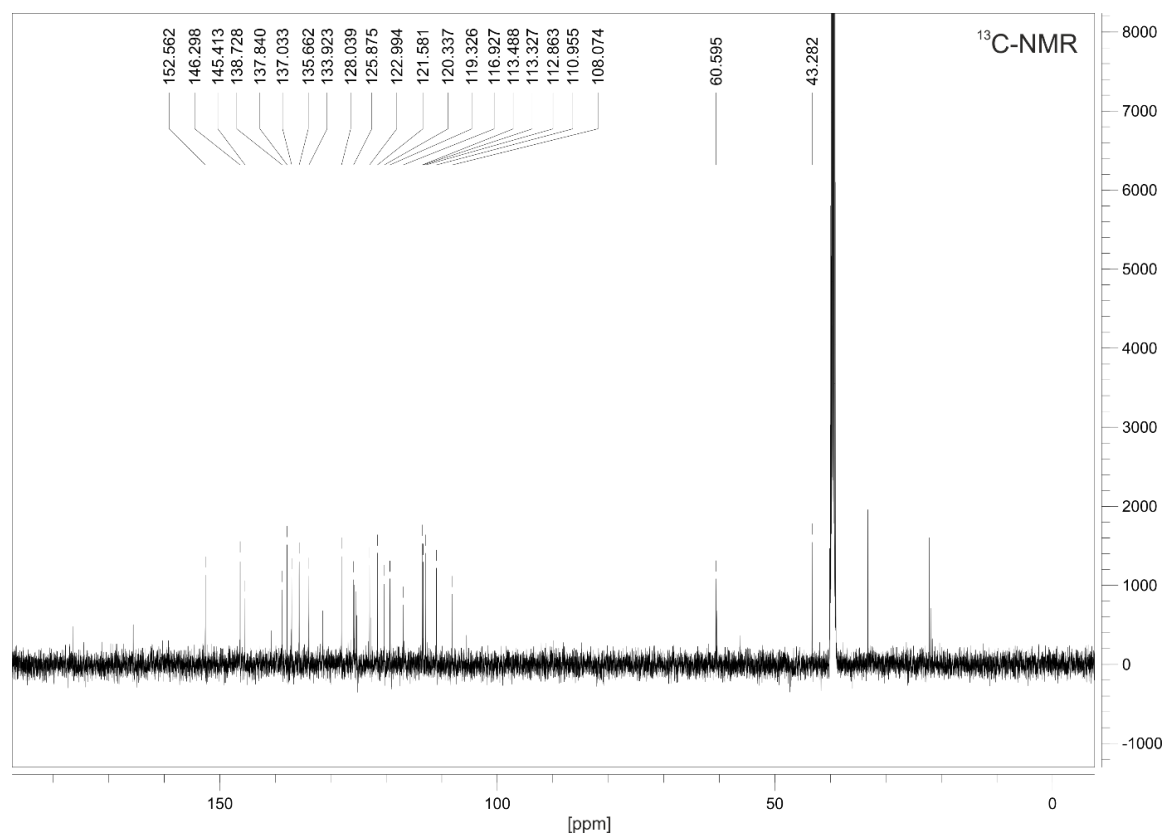
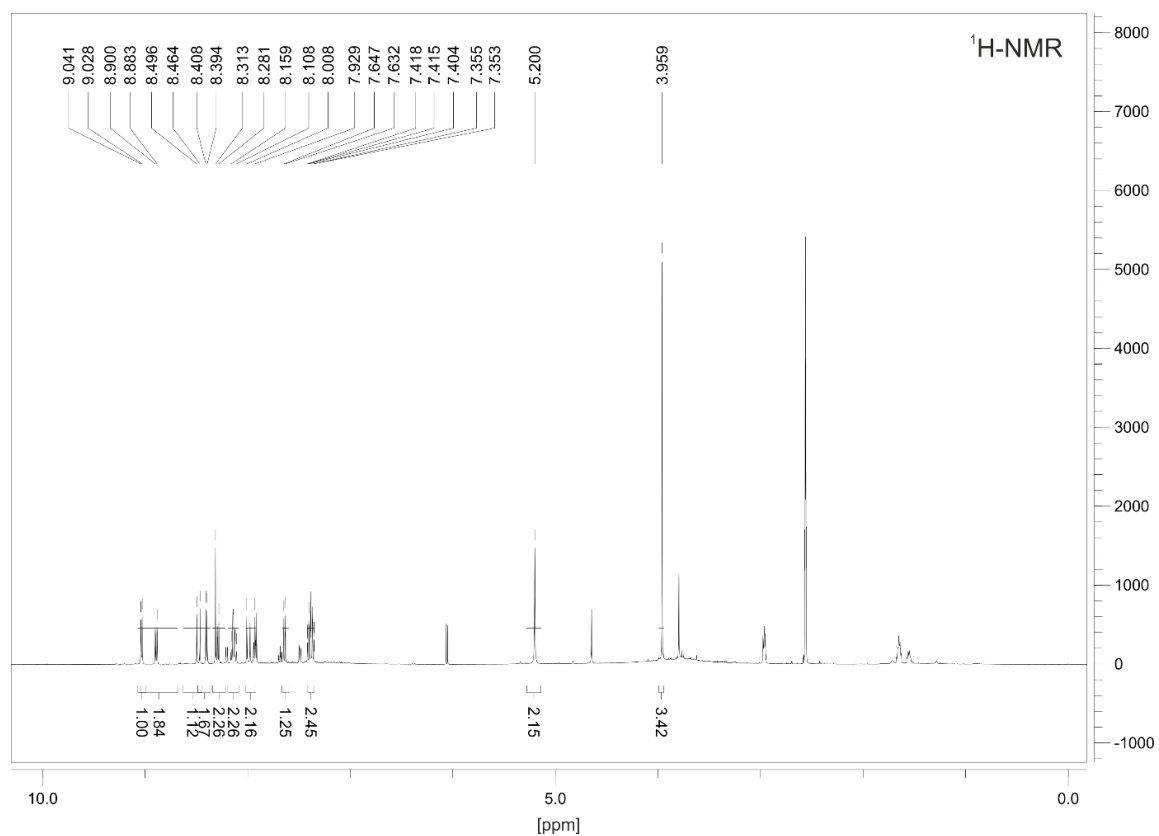




**Abbildung 9.3.3.1** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA- oder DNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5 Äq. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 25 °C in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); BO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 440 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 450 - 600 nm, TO:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 485 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 650 nm, CV:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 530 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 540 - 700 nm, Methylrot:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 494 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 500 - 700 nm, Rot:  $\lambda_{\text{ex}}$  = 480 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  = 490 - 700 nm, slit<sub>ex</sub> = 5 nm, slit<sub>em</sub> = 5 nm.

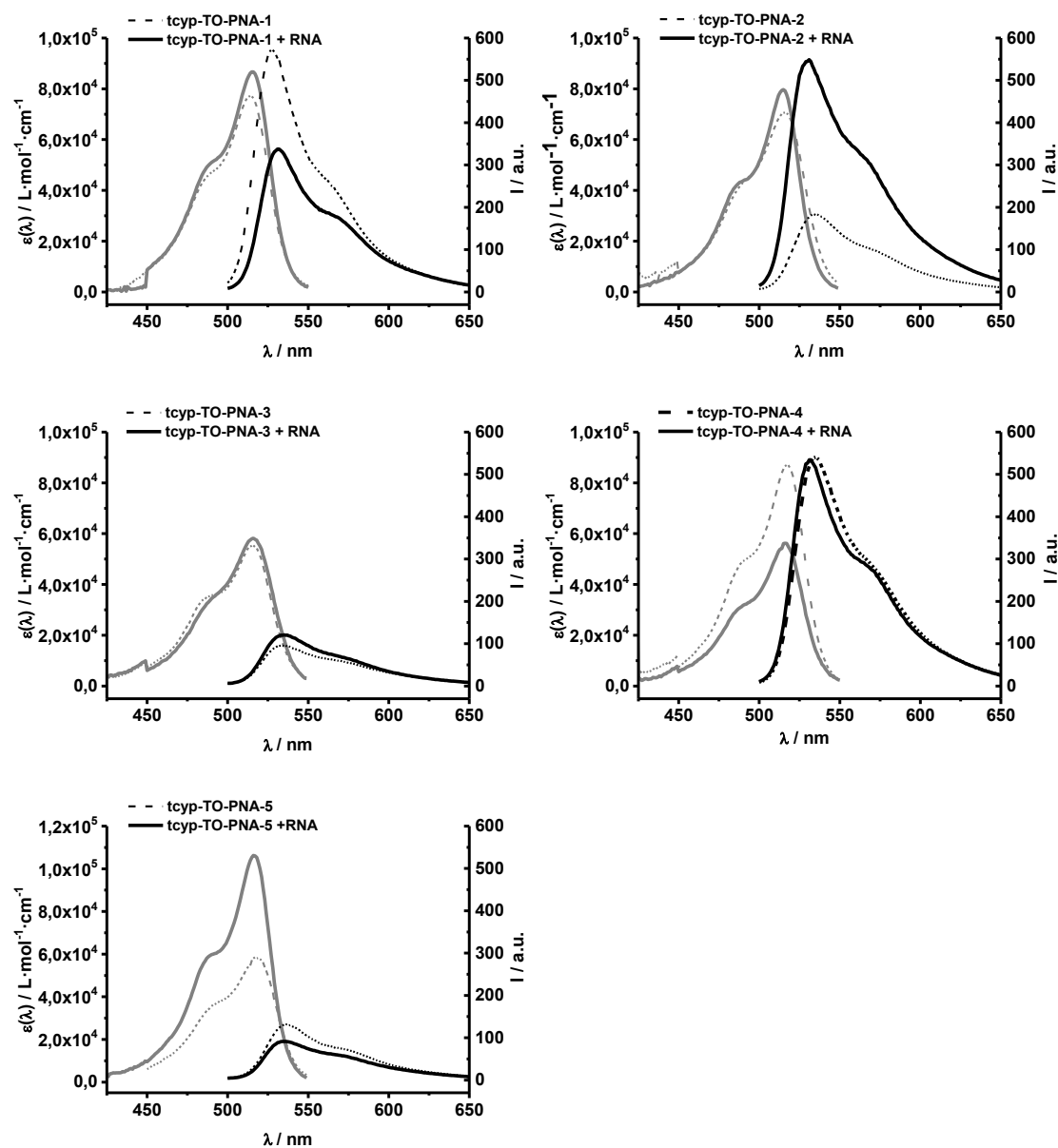


**NMR-Spektren zu Rot (4) und Methylrot (5)****Rot (4)**

**Methylrot (5)**

## 9.3.4 Anhang zu Kapitel 4.3.4

## Absorptions- und Emissionsspektren der Tcyp-PNA-FIT-Sonden



**Abbildung 9.3.5.1** Absorptions- (grau) und Emissionsspektren (schwarz) der tcyp-PNA-FIT-Sonden in Abwesenheit (gestrichelt) und Anwesenheit (durchgezogen) von komplementärer RNA- oder DNA-Zielsequenz. Bedingungen: 0.5  $\mu\text{M}$  Sonde und 5  $\text{\AA}$ q. Zielsequenz in PBS (100 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7) bei 37  $^\circ\text{C}$  in 1 ml-Küvetten (Schichtdicke = 1 cm); TO:  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 500 - 650 \text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{ex}} = 5 \text{ nm}$ ,  $\text{slit}_{\text{em}} = 5 \text{ nm}$ .

---

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver Seitz für das spannende Thema sowie die fortwährende Unterstützung und konstruktiven Anregungen während meiner Promotionszeit bedanken.

Der Einstein-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit und der IRI Graduate School für die vielen interessanten Vorlesungen, Veranstaltungen und dem interdisziplinären Austausch bei Konferenzen und Fortbildungen.

Mein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Herrmann, insbesondere Ivan Haralampiev, die mir bei biologischen Fragestellungen zuverlässig und hilfsbereit zur Seite stand. Bei Prof. Dr. Löwer und Dhana Friedrich bedanke ich mich für die Zurverfügungstellung der *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen. Prof. Dr. Marcus Frohme möchte ich für die Zurverfügungstellung der T-Zellkulturen und des Elektroporators danken. Dr. Rurack möchte ich für die Bereitstellung des Durchflusszytometers danken. Bei Dr. Imre Gaspar bedanke ich mich für die Zusammenarbeit und die hilfreichen Ratschläge bezüglich der Fluoreszenzmikroskopie.

Weiterhin gilt mein Dank Cindy Rulka, Simon Bartsch und Stephen Croke für die unterstützende Forschungsarbeit als studentische Hilfskräfte. Ebenfalls danke ich Christina Klotz für die Zellkultivierung der *Flp-In<sup>TM</sup> 293 T-REx<sup>TM</sup>*-Zellen und Andrea Knoll für die Durchführung der dazugehörigen PCR-Analysen.

Ein besonderer Dank gilt Christina Kuznia, ohne die ich das T-Zellen-Projekt nicht soweit vorangebracht hätte. Für das Korrekturlesen meiner Arbeit danke ich Christina Kuznia, Richard Houska und Sophie Schöllkopf. Meinen Laborkollegen Henrik Petszulat, Robert Zitterbart, Ulrike Reinhart und Olaf Fuchs danke ich sehr für eine unvergessliche Zeit im und außerhalb des Labors sowie für die aufbauenden und motivierenden Gespräche. Natali Dubel, Margarita di Pisa und Gunnar Bachem danke ich für die vielen inspirierenden Gespräche und fachlichen Diskussionen. Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die tolle Zusammenarbeit und Atmosphäre, die einem das Arbeiten um einiges erleichtert hat.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die ununterbrochene Unterstützung und den Rückhalt bedanken. Gleiches gilt natürlich für meine Freunde außerhalb der Arbeit, die mich während der Promotion auch mal auf andere Gedanken brachten. Mein besonderer Dank gilt Florian Kersten, der mich während der gesamten Promotionszeit motiviert und unterstützt hat.

---

## Selbständigkeitserklärung

Ich, Jasmine Chamiolo, erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 42/2018 am 11.07.2018 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

---

Unterschrift